



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Denise Alves Perez

Tese de doutorado

**Efeito da modulação da via da esfingosina na resolução da
resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS)**

Belo Horizonte

Julho/2016

DENISE ALVES PEREZ

**Efeito da modulação da via da esfingosina na resolução da
resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS)**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Julho/2016

Denise Alves Perez

**Efeito da modulação da via da esfingosina na resolução da
resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular do
Departamento de Morfologia, do Instituto de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Vanessa Pinho da Silva
Co-orientadora: Dra. Lirlândia Pires de
Sousa

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Julho/2016

O presente trabalho foi realizado nos seguintes locais: Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais; Laboratório de Sinalização na Inflamação, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais; Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. Contando com apoio financeiro do CNPq, CAPES, FAPEMIG, PRPq-UFMG e European Community's Seventh Framework Programme (FP7-2007-2013).

Dedico esse trabalho à minha família, meu pai e minha mãe, pelo apoio e amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de iniciar no ICB/UFMG meu doutorado e nele concluir.

Agradeço também às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho:

- À minha querida mãe, que tanto me ajudou, incentivou e me impulsionou em todos os meus anseios e sonhos. Te amo além dessa vida.

- Ao meu querido pai, que mesmo ausente de corpo durante toda essa Pós-Graduação, sei que olha por mim e está sempre segurando a minha mão. A saudade e o amor são imensos meu pai. Eu consegui! “Enquanto eu respirar eu vou te amar, somente enquanto eu respirar...”.

- A minha avó Regina, que mesmo não estando aqui, será sempre meu exemplo de ser humano, te amo “abuela”.

- Ao meu irmão que mesmo longe está perto, mesmo ausente se faz presente! Muito obrigada pelo apoio! Você é o melhor de mim, sangue do meu sangue, elo do meu passado! Te amo!

- Ao meu tio, tio Isidoro, tio querido, segundo pai que me ajudou não só financeiramente mas emocionalmente em todos os aspectos da minha vida!

- A minha família como um todo, vó Angelina, tia Marília, tio Deusdedit, Túlio, Lívia, madrinha, padrinho e *SP members* que torceram por mim a cada vitória!

- Ao meu namorado Bernardo, que é o meu maior fã, meu incentivador, minha motivação! Responsável por todas as graças alcançadas, rs, a partir de você minha vida mudou! Muito obrigada por estar sempre comigo! Meu parceiro! Te amo infinito.

- À minha sogra gata, profa. Dra. Guiomar Bahia, minha inspiração! E a toda família Azevedo que tanto me apoiou durante esse período! Ao meu sogro Arnaldo pelo carinho semelhante ao de um pai!

- À minha orientadora, profa. Dra. Vanessa Pinho, além de uma excelente profissional, meu maior exemplo! Você é uma amiga, uma mãe! Nunca terei palavras para te agradecer tudo que passamos juntas, tudo o que fez por mim! À você o meu MUITO OBRIGADA!

- À minha co-orientadora, profa. Dra. Lirlândia Pires Sousa, por ser um exemplo e por ter me ajudado tanto, com disponibilidade e carinho.

- Ao prof. Dr. Mauro Teixeira, por toda disponibilidade, esclarecimentos e oportunidades ímpares!

- A profa. Dra. Denise Carmona, que me acolheu primeiramente no seu laboratório com todo amor, paciência e dedicação. Carregarei você sempre no meu peito! Um exemplo a ser seguido!

- Ao prof. Dr. Gustavo Menezes, pelos ensinamentos e momentos de descontração!

- À minha amada aluna-amiga-irmã, Rayssa, que fez esse trabalho lado a lado comigo. Sem você eu não teria feito nem metade dessa tese! Te amo! Muito obrigada por tudo, pequena!

- Ao meu amado amigo Albená, que esteve ao meu lado em cada fase dessa pós graduação, me acolhendo com tanta alegria. Sua felicidade transborda! Te amo!

- Ao LARRI, grupo sob orientação da prof. Vanessa, que tem crescido em quantidade e qualidade. Resolutivos, GVHD e galerinha do exercício físico, vocês são demais! Muito obrigada pelo apoio pessoal! Valeu demais!

- Ao extenso grupo do NEI, principalmente à Débora (Xú, melhor pessoa), que esteve sempre presente nos momentos de festas, alegrias, desesperos e estudos. Juntos somos melhores! Valeu!

- As amigas de caminhada Juliana, Izabela, Renata, vocês deixaram essa vida mais produtiva e mais agradável! Muito obrigada meninas!

- Aos amigos da PPG Biocel, por dividirem as disciplinas, trabalhos intermináveis e alegrias imensuráveis! Muito obrigada.

- Ao grupo IMUNOFAR, cada professor, cada aluno, cada PCR, cada FACS e cada WB! Sem dúvida somos o melhor grupo que existe!

- A Rose, Ilma, Ilda, Frank, Hermes, sem vocês esse trabalho jamais seria feito, obrigada por me ajudarem e me acolherem sempre com sorrisos abertos!

- Aos amigos extra UFMG: Fernanda, Gabrielle, Carol, João, Daniel, Dani Lafetá, Nixon, Alexandre, as Bees, pessoal da nutrição, Diretoria, Magrezas e Divas, que entenderam minhas ausências, acolheram meus desesperos e deram paz ao meu coração! Amo vocês!

- Aos meu alunos da graduação da UFMG, que me acompanharam como monitora, professora estagiária, professora REUNI, e agora, como professora substituta. Vocês alegram meus dias!

- Aos meus professores e amigos do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Departamento de Morfologia.

- À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Prof. Cleida, Prof. Cristina e Prof. Luciana, vocês fazem parte da minha história!

- Às secretárias da graduação e da pós-graduação, Rhuanna, Kender, Maria e Fidencia, pelo carinho e atenção.

"Me perdoem por estar tão longe
(Ruth Manus)

E por tentar estar presente com tão pouco.
Venho pedir que me desculpem
Por todos os dias em que eu não estou
Por todos aniversário aos quais eu não vou
Pelas tantas vezes em que a ligação falhou
Por ter que ser tão menos do que realmente sou
Venho dizer o quanto sinto
Por todos os almoços em que meu lugar sobra
Por ainda não ter visitado a casa nova
Por não ter ajudado com as coisas da obra
Por tantas vezes colocar o amor de vocês à prova
Eu juro que queria
Queria ter ajudado a sarar todas as doenças
Queria poder ser verdadeira presença
Queria segurar aquelas sacolas imensas
Queria fazer massagem nas suas costas tão tensas
Venho me desculpar
Por todos os copos de água que eu não busquei
Por toda louça suja que eu não lavei
Por todas as piadas que eu não contei
Por todas as dores que eu não abracei
Eu juro que queria
Segurar os cabelos de quem vomitava
Segurar o elevador para quem demorava
Segurar a onda de quem tanto chorava
Segurar as mãos sem precisar dizer nada
Me perdoem
Por ser uma imagem na tela do celular
Por ser um áudio que eu nunca termino de gravar
Por ser uma história que nunca dá tempo de contar
Por ser uma ausência com a qual vocês aprenderam a lidar
Me desculpem
Pelos tropeços dos quais não ri
Pelos pensamentos que eu não li
Me desculpem
Por saber o quanto minha falta dói por aí
E por não saber fingir
Que ela não dói
Igualmente, Sempre, E tanto, Aqui."

RESUMO

A esfingosina, um importante esfingolípido derivado da membrana plasmática, exerce um papel fundamental em vários processos celulares, incluindo, proliferação celular, angiogênese, envelhecimento e apoptose. No entanto, seu papel na resolução da inflamação ainda não foi elucidado. Neste trabalho, nós propusemos avaliar o papel da via da esfingosina no acúmulo e sobrevivência de neutrófilos na cavidade pleural induzida por desafio com LPS e em neutrófilos humanos *in vitro*. Para isso, camundongos (BALB/c machos) receberam uma injeção de LPS i.pl. (250 ng/cavidade) ou PBS (grupo controle). Primeiramente, a expressão dos receptores específicos de esfingosina 1-fosfato (S1P) foi avaliada em neutrófilos recuperados da cavidade pleural ou neutrófilos murinos isolados da medula óssea estimulados com LPS *in vitro* por qPCR e western blot. Posteriormente, foi avaliado o efeito dos tratamentos com inibidores da via da esfingosina (L-Cycloserine, DL-threo-Dihydrospingosine e CAY10621) bem como de antagonistas dos receptores de S1P (FTY720, JTE013 e CAY10444) no acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural. As diferentes drogas foram administradas 4h após o desafio com LPS, tempo no qual já havia um grande acúmulo de neutrófilos, as células do lavado pleural foram coletadas 4h depois. Além disso, analisamos o efeito da administração de S1P na cavidade pleural com o objetivo de avaliar sua atividade inflamatória. Ensaios *in vitro*, utilizando neutrófilos humanos, foram realizados para estudar o efeito das drogas na apoptose deste tipo celular. Por fim, foi realizado um ensaio de eferocitose *in vivo*, a fim de avaliar o efeito das drogas na atividade de macrófagos. O desafio com LPS, tanto na cavidade pleural quanto nos neutrófilos *in vitro* induz um aumento da expressão dos receptores S1PR1, S1PR2 e S1PR3. A inibição farmacológica da via da esfingosina e os tratamentos com os antagonistas dos receptores de S1P diminuiu o acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural, aumentou a apoptose dos neutrófilos e induziu a eferocitose no local da inflamação. O mesmo efeito foi observado em ensaios utilizando neutrófilos humanos, onde ocorreu um aumento de apoptose dos mesmos. Em conclusão, a inibição da via da esfingosina mostrou-se pró-apoptótica e pró-eferocítica, podendo representar uma estratégia terapêutica pró-resolutiva para o tratamento de inflamações neutrofilicas induzidas por LPS.

ABSTRACT

Sphingosine, an important sphingolipid derived from plasma membrane, plays a fundamental role in many cellular processes including cell proliferation, angiogenesis, senescence and apoptosis. However its role to inflammation resolution remains unclear. Here, was proposed to evaluate the role of sphingosine pathway on neutrophil accumulation and survival in the pleural cavity of LPS-challenged mice and in isolated human neutrophils. For this purpose, mice received i.pl. administration of LPS (250 ng/cavity) or PBS. First, the expression of S1P receptors was evaluated in the cells of pleura or murine neutrophils stimulated with LPS, by qPCR and western blot. The next step we evaluated the effect of the treatments with sphingosine pathway modulators such as the L-Cycloserine, DL-threo-Dihydrosphingosine (DTD), CAY10621, CAY10444, FTY720 and JTE013 in the cells of pleura. Thus, the drugs are efficient in decreased the number of neutrophil and increased the percentage of apoptotic cells and phagocytosis of apoptotic cells (efferocytosis). Furthermore, we analysed the effect of S1P administration in pleural cavity to observed inflammatory activity. Human *in vitro* assay were performed to to study the drug's effects in human apoptosis. We performed efferocytosis *in vivo* assay. The LPS stimuli increased the expression of S1PRs, *in vitro* and *in vivo*. The inhibition of S1P pathway and the treatment with the antagonists of receptors are efficient in decreased the cells in the pleural cavity, increased the neutrophils apoptosis and induced the efferocytosis in the inflamed tissue. The same effect was observed in vitro assay, increased of human apoptosis. The inhibition of S1P pathway and S1PRs showed a resolute strategy.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Bcl-xL:** *B-cell lymphoma-extra large* – Linfoma de células B extra grande.
- BSA:** *bovine serum albumin* – albumina de soro bovino;
- cAMP:** *Cyclic adenosine monophosphate* - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico;
- CDK:** *Cyclin-dependent kinases* – Ciclinas dependentes de cinases;
- COX-2:** cicloxigenase-2;
- DAMP:** *damage-associated molecular patterns* – padrões moleculares associados ao dano;
- DNA:** *deoxyribonucleic acid* – ácido desoxirribonucléico;
- DTD:** DL-threo-dihydrosphingosine;
- ERK1/2:** *extracellular signal-regulated kinase* – cinase regulada por sinal extracelular;
- FADD:** *Fas-associated protein with death domain* – proteína com domínio de morte associada à Fas;
- FDA:** *Food and Drug Administration*, Departamento Americano de legalização do uso de fármacos;
- FPR:** *Formil peptide receptor* - receptor de formil peptídeo;
- GPCR:** *G protein coupled receptors* – receptor acoplado à proteína G;
- H2O2:** Peróxido de hidrogênio;
- ICAM-I:** *intercellular adhesion molecule-I* – molécula de adesão intercelular-I;
- iNOS:** *inducible nitric oxide synthase* – sintase induzida do óxido nítrico;
- IL-():** interleucina-();
- i.pl.:** intrapleural;
- i.p.:** intraperitonal;
- JAM:** *junctional adhesion molecule* – molécula de adesão juncional;
- JNK:** *c-Jun N-terminal kinase* – cinase c-Jun N-terminal;
- KO:** Knock-out;
- LPS:** lipopolissacarídeo;
- MAPK:** *mitogen-activated protein kinase* – proteína cinase ativada por mitógeno;

Mcl-1: *myeloid cell leukemia sequence 1* – leucemia mielóide seqüência 1;

MKP-1: *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1* – fosfatase de MAPKs;

MPO: mieloperoxidase;

Mres: macrófagos resolutivos;

M1: macrófagos do tipo M1;

M2: macrófagos do tipo M2;

NLR: *Nod-like receptor* – receptor do tipo Nod;

NFIL-6: *nuclear factor-IL-6* – fator nuclear da interleucina 6;

NF-κB: *nuclear factor kappa B* - fator nuclear *kappa B*;

PAMP: *pathogen associated molecular pattern* – padrão molecular associado à patógenos;

PBS: *phosphate-buffered saline* – Tampão fosfato salina;

PECAM: *platelet endothelial cell adhesion molecule* – molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1;

PI3K: fosfatidilinositol 3-cinase;

PLA2: fosfolipase A2;

PLC: fosfolipase C;

PMN: polimorfonuclear;

PMSF: *phenylmethylsulphonyl fluoride* – fenilmetilsulfonilfluoreto;

PR3: proteinase-3;

ROS: *reactive oxygen species* - espécie reativa de oxigênio;

rTNF: *receptor of tumoral necrosis factor* - receptor de fator de necrose tumoral;

S1P: *sphingosine 1-phosphate* – esfingosina 1-fosfato;

SK: *sphingosine kinase* – esfingosina cinase;

S1PR: *sphingosine 1-phosphate receptor* – receptor de esfingosina 1-fosfato;

SLPI: *secretory leukocyte protease inhibitor* - Inibidor de protease secretado por leucócitos;

TGF: *transforming growth factor* – fator de crescimento transformante;

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

TNF-α: *tumor necrosis factor alpha* – fator de necrose tumoral alfa;

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

VE-caderina: *vascular endothelial cadherin* – caderina vascular endotelial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O extravasamento perivascular auxilia na emigração de neutrófilos.	22
Figura 2 – Via metabólica, transporte e receptores de esfingosina 1-fosfato (S1P), seus inibidores e antagonistas.	30
Figura 3 - Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo.	34
Figura 4 - Diferentes passos envolvidos na eliminação de células apoptóticas.	36
Figura 5 – Via metabólica, transporte e receptores de esfingosina 1-fosfato (S1P), antagonistas dos receptores e inibidores da via metabólica.	46
Figura 6 – Demonstração visual da morfologia de um neutrófilo apoptótico.	49
Figura 7 – Demonstração visual da morfologia de um macrófago eferocítico.	50
Figura 8 – Cinética de recrutamento celular na pleura após a administração de LPS.	59
Figura 9 – Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) em células presentes na cavidade pleural.	61
Figura 10 – Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos.	62
Figura 11 - Desenho esquemático da administração dos inibidores e antagonistas dos receptores da esfingosina.	63
Figura 12 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina na inflamação pleural induzida por LPS.	64
Figura 13 – Efeito da administração dos antagonistas dos receptores de esfingosina-1-fosfato na inflamação pleural por LPS.	66
Figura 14 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos na cavidade pleural.	68
Figura 15 – Características morfológicas das células do lavado pleural após tratamento com os inibidores da via da esfingosina e os antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos na cavidade pleural.	69
Figura 16 - Efeito da administração de Z-VAD-FMK no tratamentos utilizando inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato nas células da cavidade pleural.	71

Figura 17 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na eferocitose de leucócitos na cavidade pleural.....	73
Figura 18 – Características morfológicas das células do lavado pleural após tratamento com os inibidores da via da esfingosina e os antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos na cavidade pleural.....	74
Figura 19 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos de sangue humano.....	76
Figura 20 – Características morfológicas dos neutrófilos humanos após tratamento com os inibidores da via da esfingosina e os antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato.....	77
Figura 21 – Avaliação do acúmulo de leucócitos na pleura 8 horas após a administração de S1P.....	79
Figura 22 – Características morfológicas das células do lavado pleural após tratamento com S1P.....	80
Figura 23 – Efeito da administração de esfingosina 1-fosfato e staurosporina na sobrevivência de neutrófilos de sangue humano.....	81
Figura 24 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos moduladores dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de macrófagos peritoniais.....	83
Figura 25 – Efeito da L-Cycloserine, DTD, JTE013 e CAY10444 na capacidade eferocítica de macrófagos peritoniais.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de iniciadores utilizados.....	53
---	-----------

SUMÁRIO

1. - INTRODUÇÃO.....	20
1.1 - Inflamação.....	20
1.1.1-Células envolvidas nas respostas inflamatórias agudas:	22
Neutrófilos	22
Macrófagos.....	24
1.1.2-Mediadores Inflamatórios	26
1.2 - Esfingosina	28
1.3 - Resolução da resposta inflamatória.....	33
2. - JUSTIFICATIVA	41
3. - OBJETIVOS.....	42
3.1 - Objetivo geral.....	42
3.2 - Objetivos específicos	42
4. - MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 - Animais utilizados.....	44
4.2 - Modelo murino de pleurisia induzido por LPS.....	44
4.3 - Drogas e reagentes.....	45
4.4 - Processamento das células	46
4.5 - Western Blot para análise da expressão de S1PR1, S1PR2, S1PR3.	48
4.5 - Análise da apoptose de leucócitos	49
4.6 - Análise da eferocitose de leucócitos	49
4.7 - qPCR	50
4.8 - Obtenção de neutrófilos de sangue humano	53
4.9 - Isolamento de Neutrófilos da medula óssea de camundongos	54
4.10 - Cultura de Macrófagos.....	54
4.11 - Ensaio de Eferocitose <i>in vivo</i>	56
4.12 - Análises estatísticas	57
5. - RESULTADOS	58
5.1 - Cinética do recrutamento de leucócitos após administração de lipopolissacarídeo (LPS) na cavidade pleural.....	58
5.2 - Análise da expressão dos receptores de esfingosina 1-fosfato após estímulo com LPS.	60
5.2.1 - Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) no lavado pleural de animais desafiados previamente com LPS.....	60
5.2.2 - Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) em neutrófilos purificados de medula óssea de camundongos.....	61
5.3 - Efeito dos tratamentos com inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na resposta inflamatória induzida por LPS na pleura.....	62

5.3.1 – Efeito do tratamento com os inibidores da via metabólica da esfingosina: L-Cycloserine, DL-threo-dihydrosphingosine (DTD) e CAY10621, na inflamação pleural induzida por LPS.....	63
5.3.2 – Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores de S1P: FTY720, JTE013 e CAY10444 na inflamação pleural induzida por LPS.....	65
5.3.3 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P na apoptose de neutrófilos.	67
5.3.3.1 – Efeito do tratamento prévio com um pan inibidor de caspases (Z-VAD-FMK) sobre a apoptose de neutrófilos murinos causada pelos inibidores e antagonistas dos receptores de S1P.	70
5.3.4 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P na eferocitose de células apoptóticas na cavidade pleural... 72	
5.4 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P na apoptose de neutrófilos humano.	75
5.5 – Efeito do tratamento com o esfingosina 1-fosfato no recrutamento e na sobrevivência de neutrófilos.	78
5.6 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P na apoptose de macrófagos murinos.....	82
5.7 – Efeito do tratamento com L-cycloserine, DTD, JTE013 e CAY10444 na capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais.	84
6. – DISCUSSÃO.....	86
7. – CONCLUSÃO.....	94
8. – PERSPECTIVAS	95
9. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
10. – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO.....	107
ANEXO 1 – Artigo publicado na revista Mediators of Inflammation.....	107
ANEXO 2 – Artigo publicado na revista Cell Death and Disease.	118
ANEXO 3 – Capítulo de livro publicado pela Editora Blucher s/a.....	119
ANEXO 4 – Protocolos: CEUA E COEP	120

1. – INTRODUÇÃO

1.1 – Inflamação

O processo inflamatório pode ser definido como uma reação à uma lesão tecidual causada por agentes infecciosos, trauma, cirurgia, queimadura, isquemia e câncer que induz uma complexa sequência completa de eventos visando a restauração da homeostase tecidual (Dinarello, 1997; Gabay and Kushner, 1999; Katzenstein and Myers, 1998; Nathan, 2002) . Atualmente, a resposta inflamatória tem sido abordada como um evento necessário, e portanto fisiológico, para restaurar a homeostase de tecidos e órgãos, após infecções e lesões estéreis. Entretanto, quando desregulada ou não resolvida (“finalizada”), a inflamação pode causar lesão tecidual, doenças inflamatórias crônicas, como a asma, a artrite reumatóide, a aterosclerose, a rinite alérgica, a fibrose pulmonar além de doenças metabólicas e doenças autoimunes, acarretando perda da função do órgão afetado (Marques et al., 2016). Portanto, é necessário que a inflamação ocorra de forma limitada terminando em horas ou dias (Chung, 2012; Duran-Salgado and Rubio-Guerra, 2014; Fialkow et al., 2007; Mandhane et al., 2011; McFarland and Martin, 2007; Van-Assche et al., 2011).

Os sintomas clássicos da inflamação foram descritos no século I d.C., por Cornelius Celsius e denominados como os sinais cardinais da inflamação, são eles: o rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (inchaço, causado por aumento da permeabilidade da microvasculatura e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), calor (calor, associado com o aumento do fluxo sanguíneo), e dor (em parte, devido à alterações nas terminações nervosas, como alteração de atividade

simpática, entre outros). Um quinto sinal foi descrito por Rudolf Virchow em 1858 e caracterizou a perda da função ou disfunção dos órgãos envolvidos resultante do edema e dor (Medzhitov, 2010).

A resposta inflamatória pode apresentar duas reações principais: a vascular e a celular. A resposta vascular está associada ao aumento de permeabilidade, maior vasodilatação e maior exposição de moléculas de membrana envolvidas com o processo de recrutamento celular. A resposta celular envolve a ativação, recrutamento e aumento de sobrevivência de células no sítio inflamatório. As células envolvidas são os leucócitos incluindo os neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos. As reações vasculares e celulares são mediadas por diferentes moléculas incluindo as citocinas e os fatores quimiotáticos. A liberação dos mediadores quimiotáticos induz uma sequência de eventos associados à interação do leucócito com as células endoteliais que permite o recrutamento dessas células para o tecido inflamado. Esses eventos podem ser resumidos em: 1) no lúmen do vaso sanguíneo ocorre a marginalização, rolamento e adesão do leucócito no endotélio; 2) em sequência, o leucócito transmigra através do endotélio (processo de transmigração); e 3) migra nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático – como ilustrado na Figura 1 (Lawrence and Gilroy, 2007; Luscinskas et al., 2002; Muller, 2002; Weninger et al., 2014; Yuan et al., 2012). Além disso esses fatores ativam os leucócitos e estimulam a sobrevivência dessas células no sítio inflamatório.

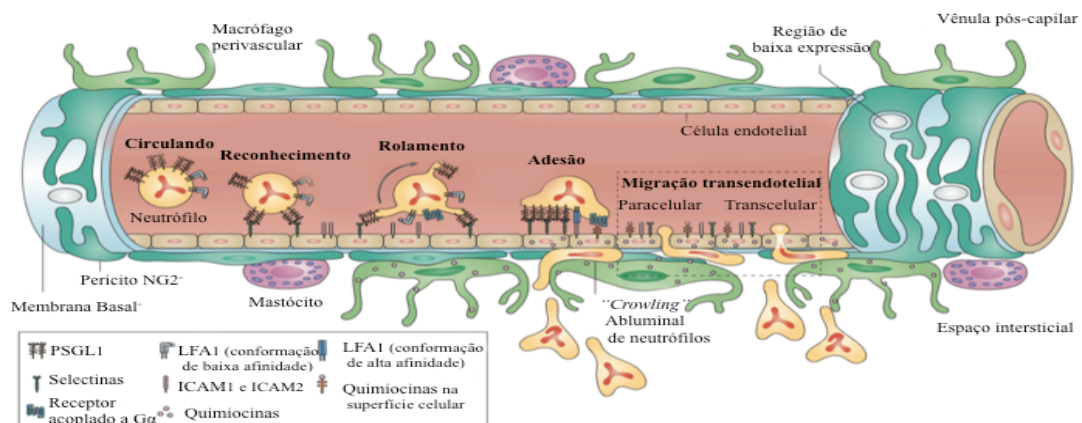


Figura 1 - O extravasamento perivascular auxilia na emigração de neutrófilos. Representação esquemática do extravasamento perivascular, que consiste em células endoteliais, a membrana basal, pericitos, macrófagos perivasculars e mastócitos. Após a adesão firme em vênulas pós-capilares, os neutrófilos transmigram através da monocamada de células endoteliais. Após a migração transendotelial, os neutrófilos rastejam sobre os pericitos que são negativos para os proteoglicanos de sulfato de condroitina. Este rastejamento abluminal depende da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), antígeno-1 associado à função leucocitária (LFA1) e MAC1. Abluminalmente os neutrófilos rastejam, após o extravasamento, em regiões de baixas densidades de proteínas da matriz extracelular na membrana basal (regiões de baixa expressão). Os macrófagos perivasculars podem auxiliar na formação dos "pontos quentes", devido à sua capacidade para produzir grandes quantidades de quimiocinas. Os mastócitos presentes próximos a parede do vaso sanguíneo também podem responder aos sinais de perigo com a liberação de fatores quimioatratantes. Fonte: Adaptado de Weninger et al., 2014 (Weninger et al., 2014).

1.1.1-Células envolvidas nas respostas inflamatórias agudas:

Neutrófilos

Os neutrófilos são as células efetoras da imunidade inata representando, em humanos, o maior grupo de leucócitos encontrados na circulação sanguínea. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para os sítios de inflamação aguda (Nathan, 2008). Vários mediadores do recrutamento de neutrófilos já são bem conhecidos. Dentre eles estão as quimiocinas, como por exemplo a CXCL1 e a CXCL2 murinos (e a CXCL8 humano), o leucotrieno B4, o fator do complemento C5a, e os peptídeos formilados como fMLP (N-formil-methionil-leucil-

phenilalanina), dentre outros (Borregaard, 2010; Zlotnik et al., 2006). Esses leucócitos polimorfonucleares são produzidos na medula óssea a partir de células tronco mielóides e, na circulação, possuem uma meia vida de 6 a 8 horas, embora recentemente este conceito tenha sofrido modificações (Tak et al., 2013). Após migrar para o tecido, a meia-vida dos neutrófilos pode ser prolongada de 3 a 5 dias pela ação de mediadores inflamatórios produzidos localmente, o que garante tempo suficiente para exercer suas ações antibacterianas e fagocitárias (Summers et al., 2010).

Os neutrófilos, bem como os macrófagos, reconhecem PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados ao dano celular), através de receptores do tipo Toll (TLRs), ou outros receptores da resposta imune inata, desencadeando ativação de cascatas sinalizadoras intracelulares com consequente ativação da expressão de genes pró-inflamatórios (Prince et al., 2011). Um dos receptores mais estudados é o TLR4, que medeia respostas às bactérias Gram negativas através do reconhecimento de lipossacarídeo de membrana, o LPS (Prince et al., 2011).

Os neutrófilos podem ser ativados por mediadores inflamatórios ou por antígenos bacterianos, aumentando a expressão de moléculas de adesão, com consequente migração para os tecidos em direção à um gradiente quimiotático (Fialkow et al., 2007). A ativação celular também está relacionada com o aumento da sua capacidade fagocítica e produção de importantes mediadores efetores da resposta neutrofílica. Os neutrófilos também apresentam grânulos que contêm produtos tóxicos bactericidas como mieloperoxidase (MPO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCl), elastases, proteinase-3 (PR3), gelatinases, collagenases, metaloproteinases e fosfolipase A2 (PLA2) (Burg and Pillinger, 2001). Estes grânulos podem se fundir com vacúolos citoplasmáticos formando o fagossomo, onde os

microrganismos serão degradados pela liberação de enzimas hidrolíticas e de espécies reativas de oxigênio, ou pode ocorrer a degranulação, onde seus produtos são secretados para o meio extracelular (Burg and Pillinger, 2001; Prince et al., 2011; Simon and Green, 2005). Além disso, proteases liberadas de neutrófilos agem como agentes flogísticos favorecendo o recrutamento adicional de PMN para o sítio inflamatório (Soehnlein and Lindbom, 2010). Outros mecanismos microbicidas dos neutrófilos são: produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), fagocitose e a liberação de “armadilhas extracelulares”, conhecidas como NETs (Amulic et al., 2012; Kolaczkowska and Kubes, 2013).

O acúmulo excessivo, a intensa capacidade dos neutrófilos em combater patógenos e a atuação dessas células em inflamações estéreis pode ocasionar danos teciduais (Jhunjhunwala et al., 2016; Summers et al., 2010). Quando os neutrófilos permanecem no local lesionado, a liberação do conteúdo dos seus grânulos continua atuando no tecido acometido de forma tóxica, levando a cronicidade da inflamação (Gupta et al., 2016). Assim, a permanência dessas células nos sítios inflamatórios, constitui-se como a base de doenças crônicas degenerativas, como artrite e diabetes, dentre outras (Miyoshi et al., 2016; Winter et al., 2016). Dessa forma, é necessário um controle refinado da permanência dessas células no tecido após desempenharem suas funções, como por exemplo, ser eliminado de forma eficiente pelos macrófagos, evitando danos exacerbados e possíveis inflamações crônicas.

Macrófagos

Outras células do sistema imune que merecem atenção são os macrófagos. Os macrófagos são células fagocíticas muito importantes na modulação da resposta imunológica. São células derivadas de monócitos e têm origem na medula óssea a partir de uma célula tronco hematopoiética comum. Em resposta ao fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), células tronco hematopoiéticas se dividem e se diferenciam em monócitos, que deixam a medula óssea, entram na corrente sanguínea e migram para diferentes órgãos e tecidos. Uma vez nos tecidos, essas células podem se diferenciar localmente, dando origem a diferentes tipos de macrófagos que podem ser residentes ou transitórios, e que vão desempenhar papéis importantes na resposta imune inata ou adaptativa (Nathan, 2008; Wynn et al., 2013). Este paradigma declara que os macrófagos teciduais residentes em todo o corpo originam a partir de precursores sanguíneos, os monócitos, os quais continuamente substituem o pool tecidual, conforme necessário, durante toda a vida. No entanto, existe um novo paradigma em que a população de macrófagos residentes surge dentro dos órgãos durante a embriogênese, expandindo-se conforme a expansão do órgão, e repopulando para manter o pool de macrófagos em um nível constante nos tecidos. Neste paradigma os monócitos são relegados ao papel de precursores de macrófagos, particularmente durante o processo inflamatório (Randolph, 2014).

Os macrófagos são considerados fagócitos profissionais, ou seja, células cuja função primária é a de fagocitar partículas, que podem ser inertes ou microrganismos. Os macrófagos também estão envolvidos na remoção de restos celulares provenientes de células apoptóticas, processo este chamado de eferocitose, que são gerados durante a remodelação de tecidos e resolução dos processos inflamatórios. Além disso, desempenham um papel importante na resposta imune adaptativa, como apresentadores de antígenos aos linfócitos (Nathan, 2008; Poon et al., 2014). Os

macrófagos detectam sinais de perigo através de receptores do tipo Toll, receptores de reconhecimento de padrões intracelulares Nod-like (NLRs) e do receptor de interleucina-1 (IL-1R) (Kono and Rock, 2008; Kono et al., 2008; Park et al., 2004).

Diferentes estímulos podem desencadear respostas dos macrófagos levando à ativação destas células nos tecidos. As citocinas produzidas por células do sistema imune podem direcionar o fenótipo destas células, dando origem a macrófagos com fisiologias distintas (Mosser and Edwards, 2008). Existe uma classificação que é muito utilizada para determinar os diferentes tipos fenotípicos de macrófagos frente a um determinado tipo de resposta. Os macrófagos podem ser ativados de forma clássica, denominados macrófagos M1 (macrófago classicamente ativados, induzido principalmente por IFN- γ), ou os macrófagos podem ser ativados de forma alternativa denominados macrófagos M2 (cicatrizadores/reparadores, induzidos principalmente por IL-4). Nesta classificação o grupo M2 compreende todos os outros tipos de macrófagos, os quais possuem uma diferença muito grande em sua fisiologia e bioquímica. Desta forma, foi denominado um terceiro tipo de macrófago, dentro desse grupo, os macrófagos resolutivos (Mres) (Ariel and Serhan, 2012; Schif-Zuck et al., 2011). O Mres desempenha um papel importante na resolução da resposta inflamatória, devido à produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, além de proteínas anti-fibróticas e antioxidantes que limitam o dano tecidual e fibrose (Ariel and Serhan, 2012).

1.1.2-Mediadores Inflamatórios

Os mediadores inflamatórios são moléculas solúveis que atuam localmente na lesão ou de forma sistêmica. São originários do plasma, de células inflamatórias ou

dos tecidos lesados, e apresentam redundância funcional. Moléculas derivadas do plasma, tais como as do sistema complemento, cininas e fibrinogênio, são ativadas e seus produtos são responsáveis pelos efeitos inflamatórios, assim como os produtos de células que produzem mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas (Carroll, 1998; Margolius, 1995; Nathan, 2002). As citocinas são proteínas secretadas com função na regulação da resposta imune, podendo regular também o tráfego e organização celulares em órgãos linfóides. As citocinas, em geral, agem como fatores de crescimento, na diferenciação e proliferação celular, e na maturação de células de medula óssea. Algumas são quimiotáticas e possuem propriedades ativadoras e supressoras, incluindo indução da morte celular programada nos mais diversos grupos celulares que determinam a natureza da resposta imune (Borish and Steinke, 2003). Dentre elas, destacam-se, a IL-1 β (Interleucina-1 β), IL-6 e TNF, que causam modificações locais, tais como edema e exsudação, ou podem agir de forma sistêmica quando sinalizam de forma parácrina, maturando e recrutando leucócitos da medula e até desencadear febre (Borish and Steinke, 2003; Nathan, 2002; Steinke and Borish, 2006). Outras citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13, participam de respostas alérgicas e induzem a diferenciação de eosinófilos, produção de muco por células caliciformes e mudança de isotipo de anticorpos (Borish and Steinke, 2003). Pertencentes à família das citocinas, as quimiocinas, denominadas citocinas quimioatrativas (Murphy, 1994), desempenham um importante papel em processos inflamatórios, primeiramente por guiarem o recrutamento e ativação de leucócitos para o sítio inflamatório e, também, por participarem dos processos de resolução e reparo (Wynn, 2008).

Já os mediadores lipídicos são lipídios bioativos que são classificados de acordo com a base da sua estrutura: derivados de ácidos graxos ômega 3; derivados

de ômega 6; derivados de fosfolipídios; e outros (Fullerton et al., 2014; Nolan et al., 2013; Shimizu, 2009). Os mediadores lipídicos são gerados por síntese transcelular e subsequentemente são exportados para o meio extracelular para transmitir seus sinais para células alvo através da ligação a receptores ligados a proteína G. Além disso, são característicos por serem produzidos e agirem localmente e por sua meia-vida curta (segundos a minutos). Esses mediadores são geralmente produzidos de acordo com a “demanda”, embora, ocasionalmente, os precursores podem ser produzidos e armazenados para facilitar a mobilização quando necessária (Murakami, 2011; Stables and Gilroy, 2011). Neste trabalho nosso foco será um mediador lipídico derivado da membrana plasmática, a esfingosina, que tem sido alvo de vários estudos recentes mostrando sua participação na resposta inflamatória.

1.2 – Esfingosina

Os esfingolipídios, descobertos em 1884, representam a principal classe de lipídios expressos nas membranas de células eucariotas. São formados estruturalmente por uma molécula principal de esfingosina e suas funções estruturais primárias estão ligadas a formação da membrana plasmática. Além de suas funções estruturais, estes lipídios têm surgido como uma fonte importante de moléculas de sinalização e estão potencialmente envolvidos em processos fisiopatológicos (Hannun, 1994; Melendez, 2008; Merrill et al., 1997; Spiegel and Milstien, 2011).

Os principais metabólitos dos esfingolipídios são a ceramida, a esfingosina e a esfingosina 1-fosfato (S1P) (Hannun, 1994; Merrill et al., 1997). A ceramida e a esfingosina agem como mensageiros secundários para sinalização da apoptose,

desencadeada por vários tipos de estresse intracelulares e por estímulos extracelulares (Mathias et al., 1998). A S1P pode agir também como um mensageiro secundário intracelular ou extracelular. No meio extracelular a S1P pode se ligar a cinco receptores de membranas acoplados a proteína G, nomeados S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 e S1PR5, promovendo assim diversas funções biológicas, entre elas, diferenciação celular migração, celular e tráfico de linfócitos. Esses receptores eram denominados anteriormente de receptores do gene de diferenciação endotelial (EDG). Na literatura já foi demonstrado que todos esses receptores são ativados por baixas doses de S1P (Chun et al., 2002). O S1PR1 é exclusivamente acoplado a subunidade alfa $G_{i/o}$ de proteínas G heterotriméricas, enquanto S1PR2 e S1PR3 se acoplam com $G_{i/o}$, G_q e $G_{12/13}$, já os receptores 4 e 5 se acoplam somente a $G_{i/o}$ e $G_{12/13}$ (Obinata and Hla, 2012). Geralmente a sinalização através de $G_{i/o}$ leva a ativação da via de PI3K/Akt prevenindo a apoptose celular e a ativação de PI3K/Rac promovendo um rearranjo do citoesqueleto e migração celular, bem como a ativação de fosfolipase C (PLC), aumentando a concentração de cálcio intracelular e a inibição de adenil ciclase reduzindo a produção de cAMP. A sinalização através de G_q primeiramente ativa a via de PLC e a sinalização através de $G_{12/13}$ promove a ativação de Rho inibindo Rac e a migração celular. O balanço dessas vias de sinalização de cada tipo de receptor determina os vários efeitos divergentes de S1P, que depende da expressão dos subtipos dos seus receptores em diferentes tipos celulares (Obinata and Hla, 2012; Parrill et al., 2012; Spiegel and Milstien, 2011; Strub et al., 2010) – Figura 2. Os receptores 1 a 3 são altamente expressos em células do sistema cardiovascular e do sistema imune (Lee et al., 1998). S1PR4 está expresso em células linfóides e células musculares (Graeler and Goetzl, 2002; Ryan and Spiegel, 2008); e S1PR5 nas células

que compõe a substância branca do sistema nervoso central, como os oligodendrócitos (Im et al., 2000; Terai et al., 2003).

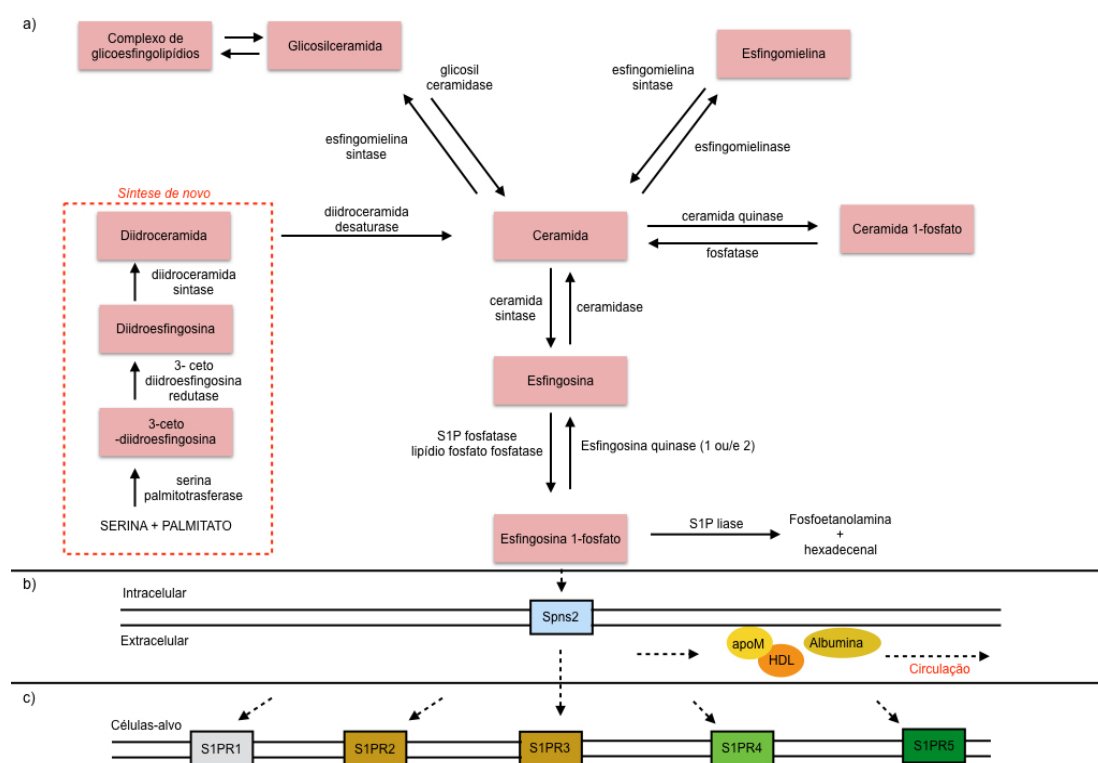


Figura 2 – Via metabólica, transporte e receptores de esfingosina 1-fosfato (S1P), seus inibidores e antagonistas. A) Metabolismo “de novo” do esfingolípido começa no retículo endoplasmático, onde a serina palmitoiltransferase une a serina mais o palmitato em 3-queto-diidroesfingosina, seguida pela conversão seqüencial de diidroesfingosina, diidroceramida e ceramida pela ação da 3-queto-diidroesfingosina redutase, diidroceramida sintase e diidroceramida desaturase, respectivamente. A ceramida, gerada também pela síntese “de novo” ou pela degradação dos esfingolípídios complexos como esfingomielina e glicosilceramídeos, é desacetilada pela ceramidase a esfingosina, seguida pela fosforilação feita pela esfingosina cinase produzindo assim a esfingosina 1-fosfato (S1P). S1P é desfosforilada à esfingosina pela S1P fosfatase ou pela lipídio fosfatase, ou é irreversivelmente degradada a fosfoetanolamina e hexadecenal pela S1P liase. B) S1P produzida intracelularmente é transportada por transportadores específicos como Spns2 e são carreadas por proteínas carreadoras como ApoM associada a HDL e a albumina. C) S1P ativa os S1P receptores 1-5, nos quais transmitem vários sinais intracelulares de acordo com a qual subunidade $G\alpha$ da proteína G e ao padrão de expressão de cada receptor a um dado tipo celular. Em destaque estão as drogas usadas em nosso trabalho. Fonte: Adaptado de Obinata e Hla, 2012 (Obinata and Hla, 2012).

O equilíbrio entre ceramida, esfingosina e S1P é o que controla as funções intracelulares a serem realizadas pela célula. A esfingosina cinase (SK) é a enzima que converte a esfingosina em S1P e é responsável por este balanço (Taha et al., 2006). A SK possui duas isoformas, esfingosina cinase 1 (SK1) e esfingosina cinase 2

(SK2). A SK1 é a mais abundante na maioria dos tipos celulares e a melhor estudada até o momento. Está ligada ao crescimento e a sobrevivência celular e sua alta expressão têm sido relacionada com crescimento tumoral. Pouco se sabe sobre as funções da SK2, mas ela parece estar relacionada com a redução do egresso de linfócitos de tecidos linfóides resultando em uma linfopenia (Chiba, 2005; Huwiler and Pfeilschifter, 2006; Spiegel and Milstien, 2007; Taha et al., 2006).

Estudos recentes têm mostrado o papel da S1P no sistema imune (Aoki et al., 2016; Maceyka and Spiegel, 2014; Mendoza et al., 2012; Pappu et al., 2007; Pham et al., 2010). O eixo de S1P e seu receptor 1 (S1PR1), regula o tráfico e a migração de linfócitos T e B, progenitores hemocitopoéticos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, células natural killer e osteoclastos (Rivera et al., 2008). Outros trabalhos demonstram que além de S1P orquestrar a diferenciação de vários tipos de células imunes, esse esfingolípido pode induzir mudanças em seus fenótipos e regular a produção de citocinas pro-inflamatórias e eicosanóides (Cyster and Schwab, 2012; Spiegel and Milstien, 2011). Alguns trabalhos mostram que as concentrações de S1P no sangue e na linfa são maiores do que nos tecidos, e o egresso de linfócitos para o timo e para órgãos linfóides secundários é dependente dessa concentração e ativação de S1PR1 (Cyster and Schwab, 2012).

Na tentativa de esclarecer o papel de S1P nos processos inflamatórios, alguns grupos de pesquisa têm usado camundongos knockout para SK1 ou SK2. Animais KO para SK1 mostraram uma melhora em quadros de colite (Snider et al., 2009) e artrite (Baker et al., 2010), enquanto outros estudos mostram que a atividade inflamatória desses animais é a mesma (Michaud et al., 2006). Em modelos de neuroinflamação (Grin'kina et al., 2012) e lesão pulmonar (Di et al., 2010) induzidos por LPS, esse animais tiveram um agravamento da doença. Já animais KO para SK2, houve uma

exacerbação em modelo experimental de infecção pulmonar bacteriana (Zemann et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que nesses animais, a deleção de SK1 diminuiu os níveis séricos de S1P, enquanto a deleção de SK2 aumenta os níveis desse metabólito, provavelmente devido a super regulação de SK1 nos animais KO para SK2 e o aumento de S1P em tecidos específicos (Liang et al., 2013; Snider et al., 2009). Em outros trabalhos, sem a utilização de animais KO, foi demonstrado que os níveis elevados de S1P aumentam o recrutamento de leucócitos para o local lesionado durante a artrite inflamatória (Lai et al., 2008). Na lesão pulmonar aguda o aumento dos níveis de S1P foi relacionado com a inibição da apoptose de neutrófilos (Lin et al., 2011). Assim, vários autores tem sugerido que S1P, pode ter funções distintas em resposta à diferentes estímulos, células e tecidos (Aoki et al., 2016; Maceyka and Spiegel, 2014).

Além disso, tem se demonstrado uma íntima associação entre S1P e produção de TNF. Essa importante citocina estimula enzimas do metabolismo de esfingolípídios como, esfingomielinases, ceramidases e SK1 (Clarke et al., 2007; Hannun and Obeid, 2008). Várias dessas enzimas estão envolvidas na sinalização de TNF, como por exemplo, células que são deficientes em ceramidase ou esfingomielinase tem uma produção diminuída de CCL5 induzida por TNF, possivelmente fazendo a regulação dos níveis de esfingosina (Pitson et al., 2003). Já a diminuição da expressão do gene que codifica a esfingomielinase neutra regula o surgimento de moléculas de adesão independente da ativação de NF- κ B (Clarke et al., 2007). Assim, vários trabalhos demonstram o papel importante da via metabólica da esfingosina na resposta inflamatória, entretanto, o papel dessa via na resolução da resposta inflamatória ainda não foi elucidado.

1.3 - Resolução da resposta inflamatória

Devido ao processo inflamatório envolver a secreção de grandes quantidades de substâncias que contribuem não somente para iniciação mas também para a manutenção da inflamação e de sua resolução, é de grande interesse entender os mecanismos responsáveis pela eliminação de leucócitos e inativação dos mediadores pró-inflamatórios secretados no sítio inflamado. Em indivíduos saudáveis a inflamação possui um limite próprio e, assim que o agente agressor é eliminado, um programa de resolução é ativado. A resolução é essencial para que haja uma resposta inflamatória adequada do hospedeiro, proteção tecidual e um retorno à homeostase após um evento inflamatório (Serhan and Savill, 2005). A resolução da inflamação é orquestrada por uma mudança no perfil dos mediadores lipídicos, de eicosanóides pró-inflamatórios para mediadores pró-resolutivos especializados seguido por um tamponamento de citocinas e quimiocinas (Buckley et al., 2014; Serhan, 2008). Durante o processo de resolução ocorre a liberação de diferentes mediadores pró-resolutivos que promovem a indução de apoptose do leucócito (especialmente PMN), bloqueiam o recrutamento de mais células polimorfonucleadas para o local acometido e são quimiotáticos para macrófagos não flogísticos (Sugimoto et al., 2016). Dentre esses mediadores, podemos citar os de natureza lipídica como as lipoxinas, prostaglandinas da série D, resolvinas das séries E e D e protectinas os quais são derivados de ácidos graxos, além de mediadores protéicos (AnnexinaA1, Galectinas) e gases - Esse processo está detalhado na Figura 3 (Dalli and Serhan, 2012; Schwab et al., 2007; Serhan et al., 2007). Esses mediadores levam a uma inibição do recrutamento celular, a morte por apoptose dos PMN infiltrados, e *clearance* das células apoptóticas pelos macrófagos, processo chamado de eferocitose (Buckley et

al., 2014; Dalli and Serhan, 2012). Vale a pena ressaltar que os leucócitos podem ser eliminados do sítio inflamatório por recirculação sistêmica, circulação linfática e por morte celular. Entretanto a principal via de retorno à homeostase de um sítio inflamatório é a eliminação dos leucócitos efetores por indução de apoptose (Serhan et al., 2007).

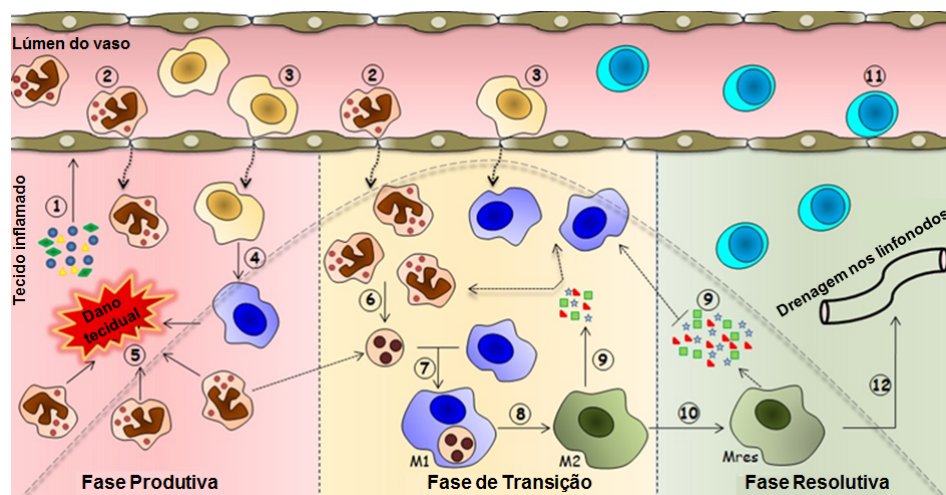


Figura 3 - Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo. A lesão tecidual (infecção estéril ou infecciosa) leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou PAMPs) pelas células residentes (macrófagos teciduais, células dendríticas e células epiteliais), os quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios (1). Nesta fase produtiva da inflamação, mediadores atuam promovendo vasodilatação e consequente aumento do fluxo sanguíneo local, modificando a permeabilidade do endotélio. Estes eventos são acompanhados por hiperemia e exsudação de proteínas plasmáticas e de líquidos (edema). As células endoteliais também são ativadas e expressam moléculas de adesão celular (selectinas e integrinas) e apresentam mediadores quimioatrativos, que permitam a captura e extravasamento de leucócitos (2-4). Leucócitos polimorfonucleares (sobretudo neutrófilos) são as primeiras células que extravasam para os tecidos inflamados (2), seguido por células mononucleares (3). Com a progressão da resposta inflamatória, há intenso influxo de leucócitos para o tecido inflamado. Estas células podem ser ativadas e se tornarem uma fonte importante de uma variedade de mediadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio (ROS) (5), o que permitirá que os leucócitos exerçam as suas funções efetoras nos tecidos. Na fase de transição da inflamação, apesar do intenso acúmulo de leucócitos PMNs, sob a ação de sinais pró-resolutivos (mediada por mediadores pró-resolutivos e diminuição dos níveis de agentes modificadores da sobrevivência celular), inicia-se a apoptose (6), seguido de fagocitose por macrófagos teciduais (eferocitose) (7). Este processo envolve vários sinais que levam à atração, a ligação e a remoção de células apoptóticas por macrófagos. Durante a eferocitose, macrófagos mudam seu fenótipo de M1 para M2 (8). Macrófagos M2 - (ou M2 like) são altamente eferocíticos e produzem moléculas anti-inflamatórias (tais como a IL-10 e TGF- β) e mediadores pró-resolutivos (9). Tais mediadores têm o potencial para inibir o recrutamento adicional de PMN, intensificar a migração de monócitos e amplificar a eferocitose. Macrófagos M2 se modificam para macrófagos resolutivos (Mres) (10), os quais apresentam capacidade fagocítica reduzida, mas, no entanto, produzem proteínas anti-fibróticas e antioxidantes que limitam o dano tecidual e fibrose. Tais eventos pavimentam o caminho para a fase de resolução da inflamação. O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, de mediadores pró-resolutivos e anti-fibróticos por macrófagos resolutivos (Mres), a repovoação por linfócitos (11) e apoptose de macrófagos ou drenagem destas células para o linfonodo local (12) encerram o processo inflamatório e restauram a homeostase do tecido. Fonte: Adaptado de Alessandri et al., 2013 (Alessandri et al., 2013).

Juntamente com os eventos descritos acima, um outro acontecimento essencial para a resolução do processo inflamatório é a eferocitose de células apoptóticas (Ortega-Gomez et al., 2013). O termo *effere*, origina-se do latim e significa túmulo ou sepultura. Eferocitose refere-se ao processo pelo qual células apoptóticas têm seus corpúsculos apoptóticos removidos e degradados. O processo que envolve a eferocitose, consiste em 4 principais passos: 1) Liberação de sinais de “find-me”, esses sinais são liberados pelas células apoptóticas e auxiliam na atração de fagócitos para o sítio inflamatório, (Gregory, 2009); 2) Exposição dos sinais de fagocitose “eat-me”, esses sinais são expostos na superfície das células apoptóticas (fosfatidilserina ou calreticulina) e promovem um reconhecimento específico pelo fagócito e subsequente internalização dos corpos apoptóticos. Assim, as células mortas são removidas antes que percam a integridade da membrana e seu conteúdo seja liberado no espaço extracelular prevenindo a exposição do tecido às enzimas tóxicas, oxidantes e outros componentes intracelulares, tais como proteases e caspases (Grimsley and Ravichandran, 2003); 3) Fagocitose dos corpos apoptóticos: os corpos apoptóticos são ingeridos e processados pelos fagócitos, onde o material fagocitado passa por uma série de eventos de maturação, levando a sua degradação (Kinchen and Ravichandran, 2008; Kinchen and Ravichandran, 2010); 4) Liberação de citocinas anti-inflamatórias: após a ingestão do corpo apoptótico pelo fagócito, são liberadas citocinas antiinflamatórias, além disso outras modificações que aconteceram durante o processamento e o reconhecimento são eliminados (Henson, 2005; Savill et al., 2002; Savill and Fadok, 2000) – Figura 4.

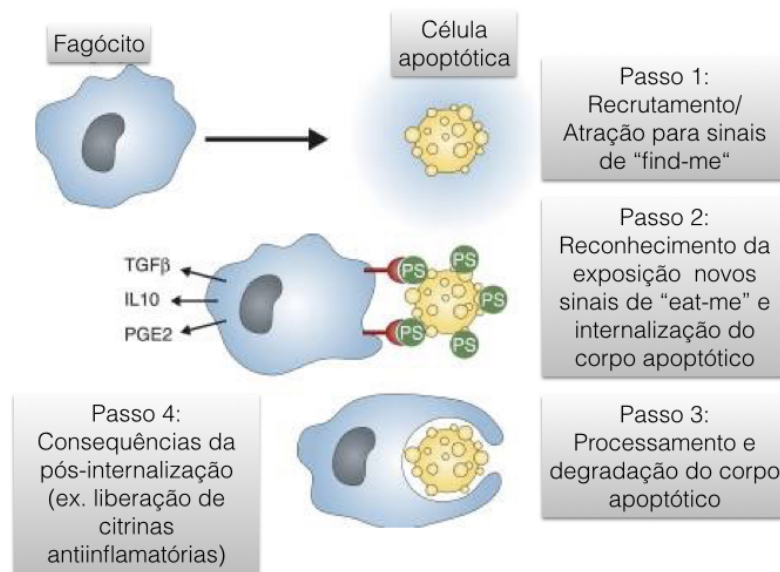


Figura 4 - Diferentes passos envolvidos na eliminação de células apoptóticas. Os sinais de “find-me” (como baixos níveis de nucleotídeos ATP e UTP, fractalcina, lisofosfatidilcolina ou esfingosina 1-fosfato) liberados pelas células apoptóticas ajudam a atrair fagócitos para as proximidades das células que estão sofrendo apoptose. Os fagócitos utilizam os receptores de fagocitose em sua superfície para encaixar com os sinais de “eat-me” das células apoptóticas. O acoplamento dos receptores (ligados ao reconhecimento da fosfatidilserina) estimulam a liberação de citocinas antiinflamatórias, tais como TGF- β , IL-10 e prostaglandina E2 (PGE2). A sinalização intracelular induzida dentro do fagócito pelas interações ligante-receptor conduz a rearranjos do citoesqueleto e internalização da célula em apoptose. O fagócito internaliza os corpos apoptóticos por uma série de passos, e a digestão apropriada parece ser importante para a absorção continuada de outras células apoptóticas pelos fagócitos. Fonte: Adaptado de Ravichandran, 2010 (Ravichandran, 2010).

A remoção imediata e eficiente de células apoptóticas por eferocitose (Gardai et al., 2005; Savill et al., 2002) é crucial para evitar a perda da integridade celular e extravasamento do conteúdo intracelular, e para limitar as respostas imunes contra auto-antígenos derivados dessas células. A eliminação de células apoptóticas é mediada, principalmente, por fagócitos profissionais como macrófagos e DCs, mas fagócitos não profissionais também podem participar deste processo (Ravichandran and Lorenz, 2007).

Todos os eventos celulares descritos acima e o desenvolvimento da inflamação (da fase efetora até a fase resolutive) são orquestrados por moléculas sinalizadoras. Durante a resolução da inflamação algumas moléculas se destacam, como é o caso das CDK's (Ciclina dependentes de cinases), MAPK (proteínas cinases ativadas por mitógenos), cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), PI3K (fosfatidilinositol 3-cinase), NF- κ B (Fator nuclear kappa B), entre outros (Perez et al., 2014). Vários estudos têm demonstrado o papel da inibição de CDK no aumento da apoptose de leucócitos e no *clearance* dessas células (Alessandri et al., 2011; Leitch et al., 2012). O mesmo se aplica às MAPKs, sua inibição contribui para reduzir os parâmetros inflamatórios em doenças mediadas por neutrófilos e eosinófilos (Duan et al., 2004; Sawatzky et al., 2006; Schuh and Pahl, 2009). Já o aumento dos níveis intracelulares de AMPc é de grande importância para a resolução de vários processos inflamatórios agudos por induzir a apoptose de granulócitos (Sousa et al., 2009; Sousa et al., 2010). A inibição de PI3K promove a resolução da inflamação caracterizada por acúmulo eosinófilos (Pinho et al., 2005) e a inibição de NF- κ B promove a resolução da resposta inflamatória em modelos de artrite (Lopes et al., 2011) e pleurisia alérgica (Sousa et al., 2009).

A resolução da resposta inflamatória pode acontecer de forma natural ou pela ação de moléculas administradas exogenamente. Assim, com o objetivo de estimular e adiantar o processo de resolução da resposta inflamatória, várias moléculas e vias de sinalização intracelulares têm sido estudadas na atualidade (Perez et al., 2014). Como é o caso do peróxido de hidrogênio estudado em modelos animais de artrite (envolvendo principalmente neutrófilos) e de asma alérgica (envolvendo principalmente eosinófilos) (Lopes et al., 2011; Reis et al., 2015) o uso da anexina A1 em modelo de pleurisia induzida por LPS (Vago et al., 2012) e o uso de rolipram

(inibidor de fosfodiesterase do tipo 4) no mesmo modelo (Sousa et al., 2010). Todos esses estudos mostram um adiantamento do processo resolutivo, por indução da apoptose, ativação de vias de morte celular e inibição das vias de sobrevivência celular. Sendo assim, todas essas estratégias tornaram-se potenciais alvos terapêuticos para tratamentos de várias doenças inflamatórias agudas e crônicas (Alessandri et al., 2013; Perez et al., 2014; Sousa et al., 2013).

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular essencial para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares e para a homeostase tecidual. Algumas doenças como o câncer, doenças auto-imunes e até mesmo síndromes degenerativas estão associadas a defeitos no controle dessa via (Cory and Adams, 2002; Poon et al., 2014). A apoptose é caracterizada por eventos morfológicos e bioquímicos que acontecem concomitantemente, ocasionando retração da célula, vacuolização do citoplasma, formação de *blebbing* (bolhas) na membrana, perda de aderência com a matriz extracelular, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo associada com clivagem do DNA (Cohen, 1993; Gilroy et al., 2004). Um dos primeiros sinais do processo apoptótico é a exposição de fosfatidilserina (PS, do inglês phosphatidylserine) na superfície da membrana celular externa, que é um sinal de reconhecimento dessas células pelos macrófagos, processo essencial para eliminação das células apoptóticas do tecido (Gilroy et al., 2004). Outro marcador importante de apoptose é a clivagem com consequente ativação de caspase-3 que é uma protease efetora que atua na clivagem de estruturas celulares e promove a decomposição celular (Janicke et al., 1998; Porter and Janicke, 1999). A caspase efetora, já ativada, cliva uma proteína (ICAD, de *inhibitor of caspase-activated DNase*) normalmente ligada a uma DNAase (CAD) no citoplasma. CAD se torna ativo, entra no núcleo e começa a cortar pontos específicos de DNA (clivagem

entre nucleossomos), desencadeando o processo de morte celular programada. Além disso a caspase degrada a enzima (scramblase) que mantém PS na camada interna da membrana e facilita a exposição de PS (Porter and Janicke, 1999).

A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas vias distintas: a via intrínseca (mitocondrial) e a via extrínseca (citoplasmática). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular. Os sinais que são transduzidos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação do citocromo c. Esse processo é desencadeado por elevações nos níveis de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2. Esta família de proteínas citoplasmáticas é caracterizada pela presença de membros que suprimem a apoptose (Ex: Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, A1) ou promovem apoptose (Ex: Bax, Bak, Bik, Bad, Bid, Bim e Puma). No citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e caspase-9, chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que posteriormente ativa caspases-3/7. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com proteínas adaptadoras como a FADD (*Fas associated deaths domains*). Essas moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3/7, executando a morte por apoptose (Best, 2008; Cory and Adams, 2002). A morte celular por apoptose exerce um papel fundamental na maioria dos processos biológicos, incluindo a resolução da resposta inflamatória, e a desregulação desse mecanismo é um importante fator na patogênese e progressão de inúmeras doenças (Gautier et al., 2013; Ortega-Gomez et al., 2013). A resolução é imperativa para que

haja uma resposta adequada do hospedeiro para proteção tecidual e para um retorno à homeostase (Ho et al., 2001; Lahorte et al., 2004; Schulte et al., 2011; Schwab et al., 2007; Sugimoto et al., 2016).

2. – JUSTIFICATIVA

Dentro do processo inflamatório, para que haja um mínimo de dano ao tecido afetado um programa de resolução precisa ser ativado. Assim, o entendimento de vias específicas envolvidas na permanência de leucócitos no tecido inflamado é de grande interesse para o desenvolvimento de estratégias capazes de interferir com o processo inflamatório. Várias moléculas de origem lipídica e protéica foram identificadas como moléculas cruciais para o processo de resolução. No entanto, o papel da via do metabolismo da esfingosina na resolução da resposta inflamatória aguda é pouco compreendido. Sabe-se que a esfingosina participa de processos biológicos importantes, tais como proliferação celular, angiogênese e desenvolvimento de tumores. Dessa forma, hipotetizamos que a via da esfingosina poderia contribuir para o adiantamento da resolução da resposta inflamatória (e, dessa forma, contribuiria para melhora geral do quadro inflamatório) por meio de apoptose de neutrófilos pela inibição da via de produção de esfingosina 1-fosfato ou de sua interação com receptores expressos em leucócitos. A elucidação de tal via de resolução do processo inflamatório facilitará propostas de novas terapias que poderão acelerar a resolução da inflamação aguda.

3. - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar o papel da via do metabolismo da esfingosina e os seus receptores na resolução da resposta inflamatória na pleurisia induzida por LPS.

3.2 - Objetivos específicos

1) Avaliar o acúmulo de neutrófilos em diferentes tempos após administração de lipopolissacarídeo (LPS) na cavidade pleural.

2) Avaliar a expressão dos receptores de esfingosina 1-fosfato em neutrófilos durante a inflamação pleural induzida por LPS e em neutrófilos de medula, estimulados ou não com LPS;

3) Avaliar o efeito do tratamento com inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na resposta inflamatória induzida por LPS na pleura;

4) Avaliar o efeito dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos seus receptores no acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural após administração de LPS;

4) Avaliar o efeito dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos seus receptores no acúmulo e na indução de apoptose de neutrófilos e macrófagos;

5) Avaliar o efeito da esfingosina 1-fosfato no acúmulo (recrutamento e sobrevivência) de neutrófilos na cavidade pleural;

6) Verificar o efeito dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos seus receptores na capacidade fagocítica de macrófagos;

7) Verificar o efeito de esfingosina 1-fosfato em neutrófilos humanos isolados de sangue periférico;

8) Verificar o efeito dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos seus receptores na apoptose de neutrófilos humanos isolados de sangue periférico.

4. - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais utilizados

Camundongos BALB/c machos de 8–10 semanas de idade foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UFMG e mantidos em condições padronizadas tendo livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG número do protocolo: 18/2013).

4.2 - Modelo murino de pleurisia induzido por LPS

Camundongos BALB/c machos de 8–10 semanas de idade foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UFMG e mantidos em condições padronizadas tendo livre acesso à água e ração. Para avaliação da cinética de migração de neutrófilos para a cavidade pleural, os camundongos foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo (4, 8, 24, 48 e 72 horas) após o desafio com 250 ng de LPS (*Escherichia coli* sorotipo O:111:B4) ou solução salina. Posteriormente, as células foram recuperadas da cavidade pleural, lavando-se esta cavidade 2 vezes com 2mL de PBS. A escolha da dose de LPS foi determinada previamente em nosso laboratório (Sousa et al., 2010). Escolhemos o tempo ideal de 4 horas após a administração do LPS para iniciarmos os tratamentos com as drogas escolhidas abaixo, 8 horas após o desafio com LPS foi feito o lavado pleural, após

a eutanásia dos animais.

4.3 - Drogas e reagentes

Utilizamos os seguintes inibidores da via da esfingosina: L-cycloserine que inibe a serina palmitoltransferase, que é o primeiro passo da síntese de esfingolipídios; o DL-threo-dihydrosphingosine (DTD) que age como um inibidor de ambas as formas da esfingosina cinase (1 ou 2) e o CAY10621, um inibidor seletivo da esfingosina cinase 1. Utilizamos também antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato, como o JTE-013 que age como antagonista seletivo do receptor S1P2 e o CAY10444 que atua como antagonista do receptor S1P3. Utilizamos também, o FTY720 um antagonista funcional de todo os receptores e a própria esfingosina 1-fosfato (S1P) e Z-VAD-FMK (*Sigma Chemical, St. Louis, MO*) pan inibidor de caspases. Os inibidores e antagonistas, foram adquiridos da *Cayman* (Ann Arbor, MI, USA), *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA), *Tocris Bioscience* (Minneapolis, MN, USA), *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* (Santa Cruz, CA, USA) e *Vinci Biochem* (Vinci, Firenze, IT) - Figura 5.

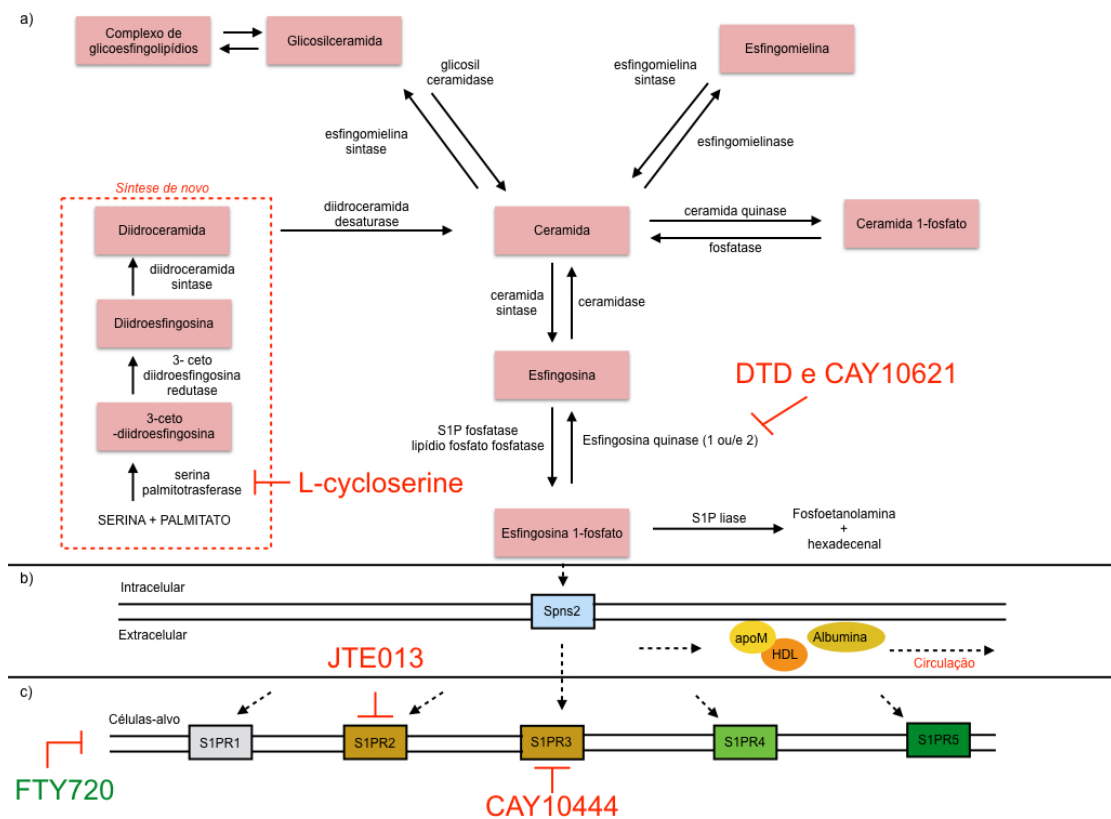


Figura 5 – Via metabólica, transporte e receptores de esfingosina 1-fosfato (S1P), antagonistas dos receptores e inibidores da via metabólica. L-cycloserine inibe a serina palmitotransferase impedindo a síntese *de novo* de esfingolipídios; o DL-threo-dihydrosphingosine (DTD) um inibidor de ambas as formas da esfingosina cinase (1 ou 2) e o CAY10621, um inibidor seletivo da esfingosina cinase 1. JTE-013 age como antagonista seletivo do receptor S1PR2 e o CAY10444 atua como antagonista do receptor S1PR3. O FTY720 um agonista reverso dos receptores de esfingosina 1-fosfato (S1P). Fonte: Adaptado de Obinata e Hla, 2012 (Obinata and Hla, 2012).

4.4 - Processamento das células

Contagem total e diferencial de células.

As células da cavidade pleural foram centrifugadas a 1.200 r.p.m. por 5 minutos e o sedimento celular ressuspenso em 200 µL de BSA 3% diluído em PBS. 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 de células. A partir dessa contagem, as células foram cito-centrifugadas utilizando

preparações em lâminas de citospin (Shandon III) com as células ressuspensas em albumina, de forma que a lâmina contivesse aproximadamente 70 mil células. As lâminas foram coradas com o método de May-Grunwald-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), neutrófilos e eosinófilos, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células a cada contagem.

Obtenção dos extratos celulares

Células recuperadas da cavidade pleural foram lisadas pela adição de 100 µL 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), e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i), sendo o sobrenadante aliquoteado e guardado à 20°C até o momento de uso.

Dosagem de proteínas totais no lavado pleural

Para realizar a dosagem de proteínas totais das células recolhidas pelo lavado pleural, foi utilizado o kit *Bio-Rad Protein Assay* (*Bio-Rad Laboratories*) 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 realizado uma curva padrão utilizando como solução padrão de BSA 1 mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a

leitura foi feita em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) a 595 nM. A absorbância das amostras foi comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 µg/mL a 2 µg/mL e os resultados foram expressos em µg/mL.

4.5 - Western Blot para análise da expressão de S1PR1, S1PR2, S1PR3.

Os extratos protéicos totais (50 µg) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão (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 10-15% de poliacrilamida/SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose (*Hybond™ ECL™, GE Healthcare*). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-*Tween* 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com PBS-*Tween*, e incubadas com o anticorpo de interesse à 4°C por uma noite. Os anticorpos utilizados no presente projeto foram EDG-1, ADG-3, EDG- 5 (S1PR1, S1PR2, S1PR3, respectivamente) (*Santa Cruz Biotechnology*) e anti-βactina (*Sigma Chemical, St. Louis, MO*). Após nova lavagem com PBS/*Tween* e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário respectivo ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora *ECL-Plus (GE Healthcare)*, expostas contra filme de raio X (*Hyperfilm ECL, GE Healthcare*) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante.

4.5 - Análise da apoptose de leucócitos

A apoptose dos leucócitos presentes no lavado pleural dos animais desafiados com LPS, com ou sem os tratamentos, foi avaliada morfológicamente. Para confirmação da apoptose via caspases, foi usado um pan inibidor de caspases, Z-VAD-FMK, 30 minutos antes dos tratamentos.

Caracterização morfológica da apoptose: As células (7×10^4 células) recuperadas da cavidade pleural foram cito-centrifugadas, fixadas e coradas com *May-Grunwald-Giemsa* e contadas (500 células por lâmina) utilizando microscópio ótico para determinar a porcentagem de células com morfologia apoptótica – como demonstrado na figura 6.

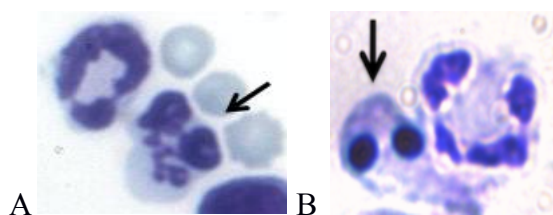


Figura 6 – Característica morfológica de um neutrófilo apoptótico. Nas setas neutrófilo apoptótico murino de cavidade pleural (A) e neutrófilo de sangue periférico humano (B). Em ambas as fotos existem neutrófilos viáveis.

4.6 – Análise da eferocitose de leucócitos

A eferocitose dos leucócitos presentes no lavado pleural dos animais desafiados com LPS, com ou sem os tratamentos, foi avaliada morfológicamente.

Caracterização morfológica da eferocitose: As células (5×10^4) recuperadas da cavidade pleural serão cito-centrifugadas, fixadas e coradas com *May-Grunwald-Giemsa* e contadas (500 células por lâmina) utilizando microscópio ótico para determinar a porcentagem de células com morfologia eferocítica (observa-se células mononucleadas com corpos apoptóticos em seu citoplasma) – como demonstrado na figura 7.

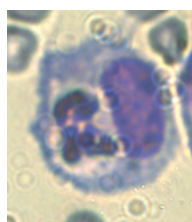


Figura 7 – Demonstração morfológica de um macrófago com um neutrófilo internalizado por eferocitose. Na foto um macrófago de cavidade pleural com material eferocitado em seu citoplasma.

4.7 – qPCR

Extração do RNA:

O RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol®, seguindo as recomendações do fabricante com algumas alterações do protocolo original. Inicialmente, 10^6 células foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL, onde foram separadas do meio de cultura que as continha através de centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm. Descartado o meio, o pellet com as células foi homogeneizado com 1 mL de Trizol® e deixado em temperatura ambiente por 5 minutos para a completa dissociação dos complexo nucleoproteico. Depois, 200 μ L de clorofórmio foram adicionados ao tubo, que foi agitado em vórtex e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos para separação das fases. Em seguida, procedeu-se uma nova centrifugação por 10 minutos

a 10000 rpm. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Sobre essa fase aquosa foram pipetados 500 μ L de isopropanol e em seguida, 5 μ g de glicogênio estéril. O glicogênio facilita a extração, concentração do RNA e visualização do pellet formado. Após a adição do glicogênio, os tubos contendo o RNA foram deixados por 24 horas a -20° C, para precipitação a frio do ácido nucleico. Após o período citado, foi realizada centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm, com a qual se obteve um pellet translúcido e claro no fundo do tubo. A solução de isopropanol e glicogênio foi descartada por inversão direta do tubo. O pellet foi então lavado por duas vezes através da adição ao tubo de 1 mL de álcool etílico a 75% em água ultrapura livre de RNase seguida de centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm. Depois disso, a solução sobrenadante foi descartada por inversão e o tubo foi deixado à temperatura ambiente até que não houvesse resquícios ou gotículas de álcool em seu interior. Em seguida, foram adicionados 20 μ L de água ultrapura livre de RNase e o tubo foi aquecido a 60° C para facilitação da dissolução do pellet. Em seguida, o tubo contendo o RNA em solução foi levado ao freezer e armazenado a -80° C.

Confecção de cDNA:

O tubo contendo o RNA foi retirado do armazenamento a -80° C e imediatamente transferido para um recipiente com gelo para que seu conteúdo pudesse descongelar. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e a dosagem da concentração de RNA foi realizada com o auxílio do NanoDrop1000. Depois, as amostras foram diluídas em água ultrapura livre de RNase para que todas contivessem 2 μ g de RNA em 10 μ L de solução em tubo de 0,5 mL. Sobre esse volume foram adicionados 2 μ L de OligoDT (5'-(TTT)5-3'), uma sequência curta de 15 bases de timidina, que se anelará à cauda poli-A do RNA mensageiro. O tubo contendo os 12 μ L foi aquecido a

70° C por 5 minutos e em seguida, acondicionado imediatamente em gelo. Sobre esse volume foram adicionados 8 µL de uma mistura contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III, inibidor de RNase (RNase Out), um agente redutor para proteção da reação (ditiotreitól, DTT) e o tampão concentrado da mesma enzima. A solução final foi levada ao termociclador e mantida a 25°C por 5 minutos, 50° C por 90 minutos, 70° C por 15 minutos e em seguida, 4° C. O cDNA resultante foi diluído em 1:2 em água ultrapura livre de DNase e armazenado a -20° C até o uso.

PCR quantitativa (qPCR):

Para a condução da qPCR, foi feita inicialmente uma mistura com o reagente Power SYBR® Master Mix (que contém nucleotídeos livres, corante intercalante SYBR® Green, enzima DNA polimerase e seu respectivo tampão) e os pares de iniciadores (“primers”) para uma concentração final de 0,5 µM. Um volume de 8 µL desta mistura foi distribuída em placa de 96 poços e em seguida as amostras foram adicionadas aos poços em duplicata. A reação aconteceu com o auxílio do instrumento 7500 Fast (Applied Biosystems). Os resultados, dados pelo ciclo limitante (threshold cycle, CT), foram calculados através do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001), normalizados pela expressão do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e apresentados em variação numérica (aumento ou redução) em relação à mesma (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabela 1: Lista de iniciadores utilizados (Zhang et al., 2012).

Gene	Sequência dos iniciadores	Tamanho do fragmento
<i>Gapdh</i> (controle)	Senso: 5'-ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA -3'	75 pb
	Antissenso: 5'-CGCAATCCGTTACACCCGA - 3'	
<i>Slpr1</i>	Senso: 5'-ACTACACAACGGGAGCAACAG-3'	202 pb
	Antissenso: 5'-GATGGAAAGCAGGAGCAGAG- 3'	
<i>Slpr2</i>	Senso: 5'-CTCACTGCTCAATCCTGTCATC-3'	234 pb
	Antissenso: 5'-TTCACATTTTCCCTTCAGACC- 3'	
<i>Slpr3</i>	Senso: 5'-TTCCCGACTGCTCTACCATC-3'	221 pb
	Antissenso: 5'-CCAACAGGCAATGAACACAC- 3'	

4.8 – Obtenção de neutrófilos de sangue humano

Os neutrófilos presentes no sangue venoso coletado de doadores foram isoladas pelo meio Histopaque (densidade 1,119 e 1,1171), utilizado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Chemical, St. Louis, MO). O sangue coletado foi adicionado a um tubo contendo Histopaque, na proporção de 5,0 mL sangue/5,0 mL Histopaque. Os tubos foram centrifugados (150 x g), em temperatura ambiente, até a completa separação das bandas celulares. A camada de neutrófilos foi coletada com o auxílio de micropipeta, e, a seguir, as células foram lavadas com meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO), e centrifugadas (150 x g, 10 min, temperatura ambiente). Este procedimento foi repetido outras duas vezes. Logo após, as células foram ressuspensas em 1,0 mL do mesmo meio. Foi realizada a contagem total das células purificadas (>95% de purificação). Para a contagem total, 10 µL da solução de células foram adicionados à solução de Turk (90 µL), e as células foram

contadas em câmara de Neubauer. Para receber os tratamentos, as células foram incubadas (em placas de 96 poços) em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, a 37°C. Esse procedimento foi autorizado via COEP 013190203000-11 – Anexo 4.

4.9 – Isolamento de Neutrófilos da medula óssea de camundongos

Os neutrófilos foram isolados de medula óssea de camundongos por meio de um gradiente de densidade (Ficoll). A purificação de neutrófilos consiste nas seguintes etapas: 1) Obtenção da medula óssea e lavagem; 2) Sedimentação por centrifugação; 3) Se necessário, lise hipotônica para remoção de eritrócitos remanescentes; 4) Sedimentação por centrifugação em gradiente de densidade, para separar células mononucleares de polimorfonucleares. Os neutrófilos se localizam na fase inferior do gradiente. Uma proporção desejável de 90% de pureza foi confirmada após citocentrifugação. As células foram tratadas com LPS a 100 µM durante 2 horas e após esse período foram coletadas para ensaio de qPCR. As células foram fixadas e coradas com *May-Grunwald-Giemsa* e contadas (500 células por lâmina) utilizando microscópio ótico.

4.10 - Cultura de Macrófagos

Obtenção de macrófagos peritoneais: Foram injetados na cavidade peritoneal dos camundongos 2 mL de Tioglicolato a 3% a fim de se obterem os macrófagos inflamatórios. Após 3 dias os animais foram eutanasiados por sobredose de

anestésico. Para se conseguir o maior conteúdo possível da suspensão celular, foi injetado rapidamente na cavidade peritoneal dos camundongos 4 mL de PBS e retirados com pipeta de Pasteur (lavado peritoneal).

Cultura: Células recolhidas do lavado peritoneal foram centrifugadas 10 min 1500 rpm a 4 °C. Após a centrifugação, realizou-se o descarte do sobrenadante e a lise de hemácias acrescentando 9 mL de água de injeção e 1 mL de PBS 10x filtrado. Após a lise de hemácias, centrifugou-se por 10 min e o pellet foi ressuspensionado em meio RPMI (1 a 2 mL por garrafinha de cultura de 25 cm²). Uma alíquota foi retirada para análise da viabilidade celular com Azul de Tripán. As células foram plaqueadas e incubadas por 4 horas na estufa para o macrófago aderir. Após esse tempo as células não aderentes foram retiradas (sobrenadante) e os macrófagos aderidos foram ressuspensionados em 1mL de PBS e preparados para citometria de fluxo. Todas as incubações foram realizadas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂, a 37°C.

Citometria de fluxo: Para caracterizar os macrófagos apoptóticos utilizamos a técnica de citometria de fluxo (aparelho Becton Dickenson FACScan). As células recuperadas da cultura foram plaqueadas (em placa de fundo em “U”, 96 wells ou em eppendorfs de 1,5 mL) aproximadamente 200.000 células/well. Os anticorpos para marcação de superfície (F4/80 e GR1), os controles negativos (isotipos IgG1 e IgG2a), diluídos na solução de diluição de anticorpos, foram adicionados nas concentrações previamente padronizadas, na quantidade 20 µL/well ou eppendorf e incubados por 30 minutos, 4°C sobre abrigo da luz. Em seguida adicionou-se 150 µL/well de wash B gelado e as

células foram centrifugadas. Posteriormente foi adicionado 190 uL de “binding buffer, 5 uL de anexina-V marcada com FITC (Kit TM ApoDETECT anexina V-FITC, Invitrogen) e 5 uL de iodeto de propídio (marcador de perda da integridade da membrana nuclear). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as células foram levadas ao aparelho para posterior leitura.

4.11 - Ensaio de Eferocitose *in vivo*

Esse protocolo foi adaptado dos protocolos utilizados por Newson e cols., 2014 e Dalli e cols., 2012 (Dalli et al., 2012; Newson et al., 2014).

Os camundongos receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de zimosan (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na dosagem de 0,1 mg/animal. Setenta e duas horas após os animais receberam 2×10^6 neutrófilos humanos apoptóticos i.p. Trinta minutos antes da administração de neutrófilos apoptóticos, os animais receberam por via i.p os tratamentos: L-Cycloserine (10 mg/kg i.p.), DTD (3 mg/kg i.p.), JTE013 (3 mg/kg i.p.) e CAY10444 (3 mg/kg i.p.), no grupo controle somente PBS foi injetado.

A apoptose dos neutrófilos humanos foi induzida pela incubação com staurosporina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na concentração de 10 μ M por poço durante 1 hora, foi adicionado 5×10^6 células por poço. Três horas após a injeção neutrófilos apoptóticos os animais foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi recolhido com 4 mL de PBS com pipeta Pasteur e as células preparadas para análise em lâminas preparadas em citocentrífuga, fixadas e coradas com *May-Grunwald-Giemsa* e contadas (500 células por lâmina) utilizando microscópio ótico para

determinar a porcentagem de células com morfologia eferocítica (como demonstrado anteriormente).

4.12 - Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida do teste Newman-Keuls, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0.05$. Os resultados são apresentados como média \pm EPM (Erro padrão da média). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software GraphPad Prism 5.0*.

5. – RESULTADOS

5.1 – Cinética do recrutamento de leucócitos após administração de lipopolissacarídeo (LPS) na cavidade pleural.

Com o objetivo de confirmarmos o modelo já estabelecido pelo nosso grupo (Sousa et al., 2010) e definirmos em qual momento iríamos administrar os tratamentos fizemos uma cinética de recrutamento de leucócitos após a administração de LPS na pleura de acordo com o desenho experimental (Figura 8A). Oito horas após a injeção de LPS houve um acúmulo significativo de leucócitos na pleura e esse acúmulo se manteve até a 48^a hora. O acúmulo de neutrófilo já era significativo (Figura 8D). 4 horas após a injeção de LPS, manteve-se alto até a 24^a hora e reduziu no tempo de 48h. Além disso, não houve alteração no acúmulo de células mononucleares nos tempos anteriores à 48^a hora. Esses resultados estão de acordo com os resultados prévios já publicados pelo grupo (Sousa et al., 2010; Vago et al., 2012; Vago et al., 2015).

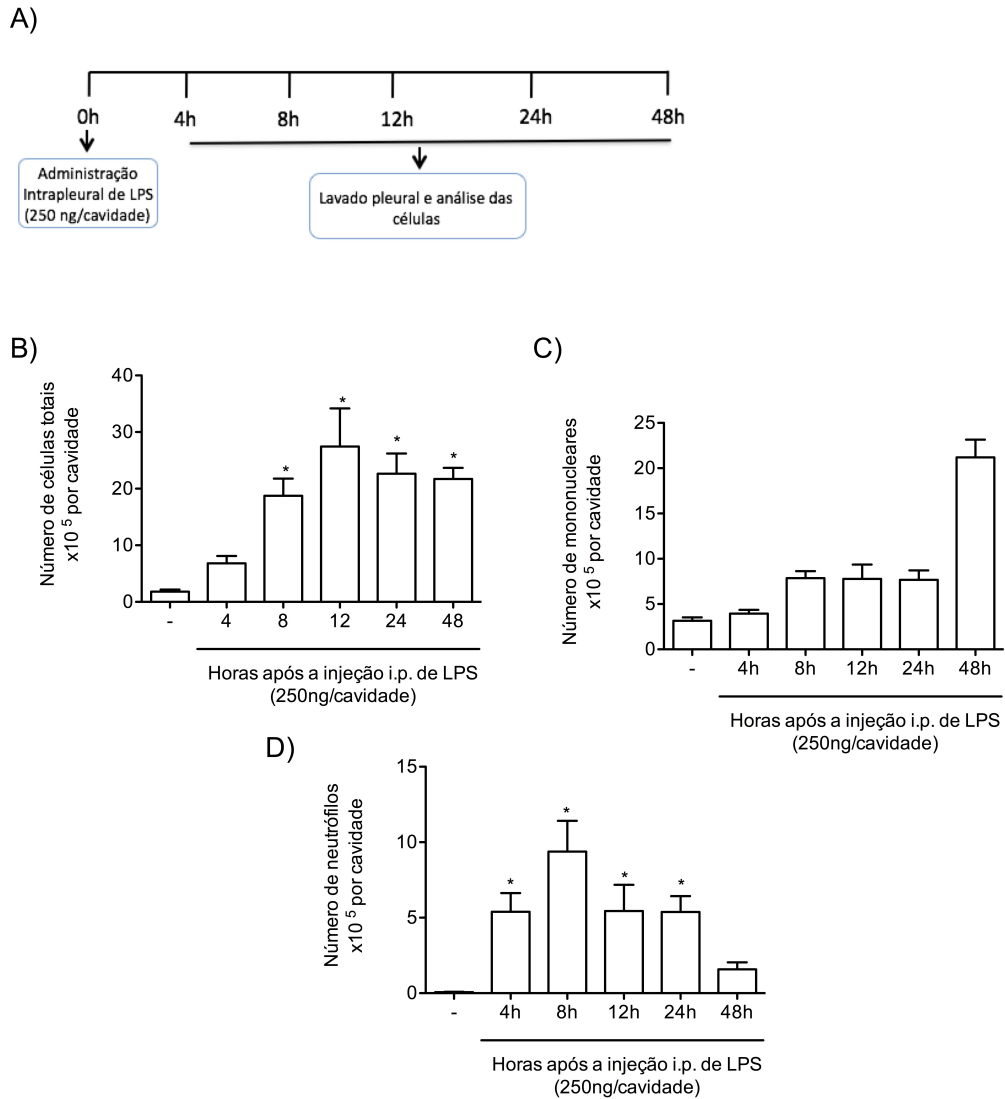


Figura 8 – Cinética de recrutamento celular na pleura após a administração de LPS. LPS (250 ng/cavidade) foi administrado na cavidade pleural e após 4, 8, 12, 24, 48h, as células foram coletadas, através do lavado pleural, para avaliação quantitativa e qualitativa dos leucócitos por caracterização morfológica. O grupo controle recebeu PBS. A) Estratégia experimental; B) Número total de células por cavidade, C) Número de células mononucleares por cavidade, D) Número de neutrófilos por cavidade. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu PBS intrapleural. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

5.2 - Análise da expressão dos receptores de esfingosina 1-fosfato após estímulo com LPS.

5.2.1 – Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) no lavado pleural de animais desafiados previamente com LPS.

Para avaliarmos a expressão dos receptores de esfingosina-1-fosfato após administração intrapleural de LPS traçamos o seguinte desenho experimental (Figura 9A). No tempo analisado (4h) houve aumento da expressão dos mRNAs para os receptores 2 e 3 (S1PR2 e S1PR3) as após o desafio com LPS em relação aos animais que foram desafiados com PBS – Figura 9(B-D). Entretanto, a avaliação da expressão desses receptores por WB mostraram que existe um aumento da expressão de S1PR1, S1PR2 e S1PR3 na cavidade pleural estimulada com LPS – Figura 9(E-G). Esses dados mostram que os receptores de esfingosina 1-fosfato são regulados durante a resposta inflamatória induzida por LPS.

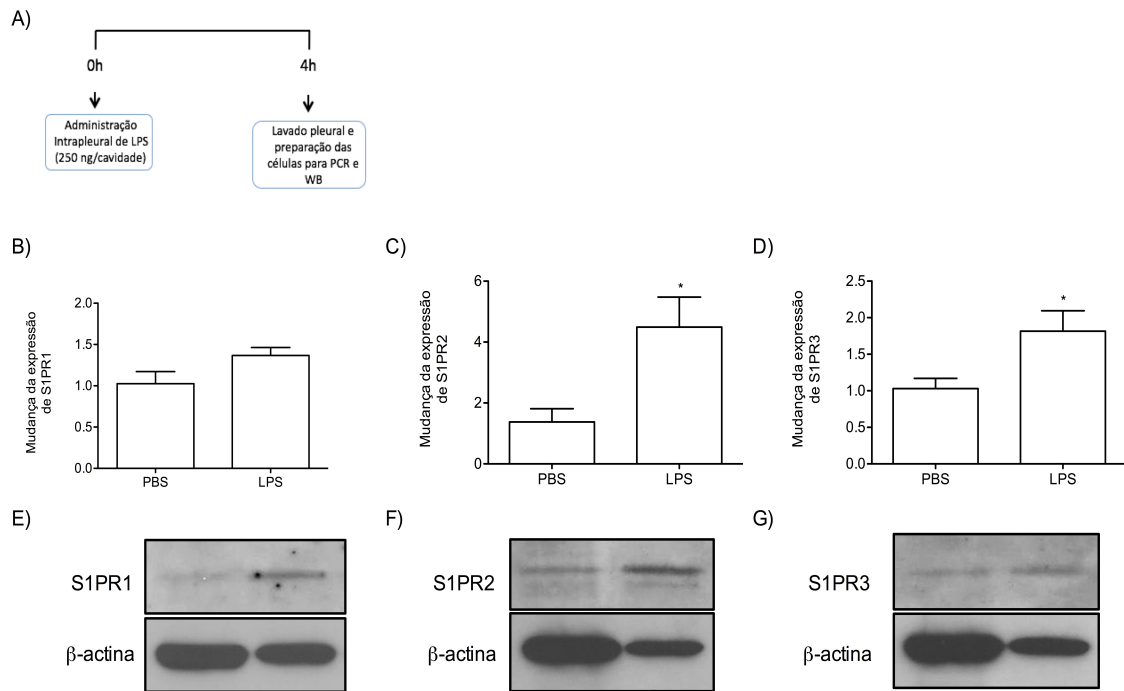


Figura 9 – Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) em células presentes na cavidade pleural. LPS (250 ng/cavidade) foi administrado na cavidade pleural de camundongos e 4h após o desafio os animais foram eutanasiados e as células coletadas para ensaio de PCR e Western Blott. Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. A) Estratégia experimental. B) Expressão do receptor 1 (S1PR1); C) Expressão do receptor 2 (S1PR2); D) Expressão do receptor 3 (S1PR3). E), F) e G) expressão de S1PR1, S1PR2, S1PR3, respectivamente via Western Blott – logo abaixo foi representado como controle a β -actina. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu PBS intrapleural. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6)

5.2.2 – Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) em neutrófilos purificados de medula óssea de camundongos.

Para avaliar se o LPS poderia induzir um aumento na expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1 fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) diretamente nos neutrófilos, essas células foram purificadas da medula de camundongos e estimuladas com LPS *in vitro* durante 2 horas – Figura 10A. O grupo que não recebeu estímulo foi considerado grupo controle. Como demonstrado pelo gráfico os receptores de S1P

não tiveram uma diferença estatística. Contudo, esse experimento foi realizado uma única vez e será repetido para termos maior fidedignidade dos dados.

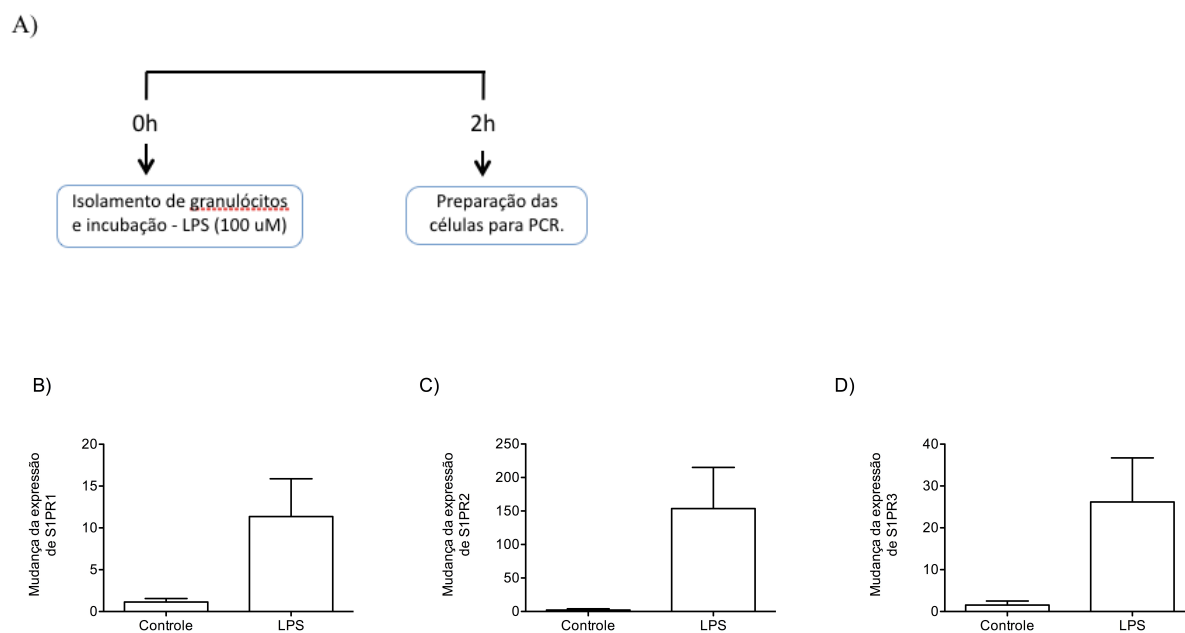


Figura 10 – Expressão dos receptores 1, 2 e 3 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, S1PR2 e S1PR3) em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos. LPS (100 uM) foi administrado em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos, 2 h após a incubação, as células foram coletadas e armazenadas para ensaio de PCR. As células que não receberam estímulo foram consideradas como grupo controle. A) Estratégia experimental. B) Expressão do receptor 1 (S1PR1); C) Expressão do receptor 2 (S1PR2); D) Expressão do receptor 3 (S1PR3). * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que não recebeu estímulo. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6)

5.3 – Efeito dos tratamentos com inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na resposta inflamatória induzida por LPS na pleura.

Para alcançarmos nosso seguinte objetivo específico, fizemos o desenho experimental descrito na figura 11. Os animais foram tratados, intraperitonealmente, 4h após o desafio com LPS (tempo onde se tem um grande acúmulo de neutrófilos na

cavidade pleural). No tempo de 8h após a injeção intrapleural de LPS, os animais foram eutanasiados e o lavado pleural foi coletado para posterior análise.

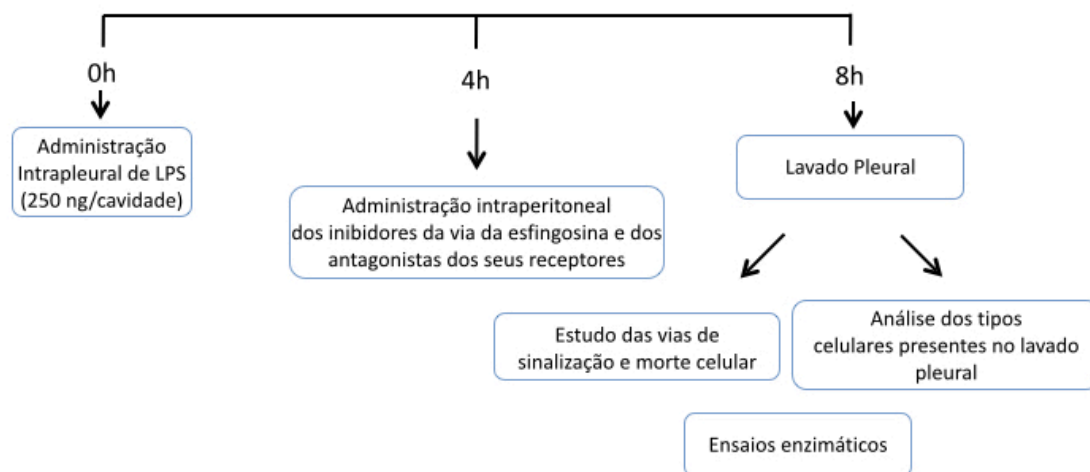


Figura 11 - Desenho esquemático da administração dos inibidores e antagonistas dos receptores da esfingosina. Os animais receberam LPS intrapleural no tempo de 0h, 4h após a administração de LPS os tratamentos foram administrados pela via intraperitoneal. No tempo de 8h os animais foram eutanasiados e o lavado pleural foi coletado, para análise das células contidas no mesmo.

5.3.1 – *Efeito do tratamento com os inibidores da via metabólica da esfingosina: L-Cycloserine, DL-threo-dihydrosphingosine (DTD) e CAY10621, na inflamação pleural induzida por LPS.*

Para isso, os animais receberam, 4 horas após o desafio intrapleural com LPS, uma injeção (i.p.) de L-Cycloserine, droga que inibe o início da síntese de esfingolipídios – inibidor da serina palmitoiltransferase, nas doses: 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg; DTD, um inibidor de ambas as isoformas da esfingosina cinase (1 ou 2) impedindo que a esfingosina seja fosforilada e transformada em esfingosina 1-fosfato nas doses: 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg; e CAY10621, um inibidor seletivo da esfingosina 1-cinase, nas doses de: 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg. Observamos que todas as drogas utilizadas causaram uma diminuição do acúmulo de células totais e de neutrófilos na cavidade

pleural. No caso da L-Cycloserine, as doses mais eficazes foram as de 1,0 e 3,0 mg/kg – Figura 12A e B. Com relação ao DTD e ao CAY10621, todas as doses utilizadas foram eficazes na diminuição do acúmulo das células – Figura 12C-F. Não houve uma mudança quantitativa nas células mononucleadas encontradas em todos os grupos analisados.

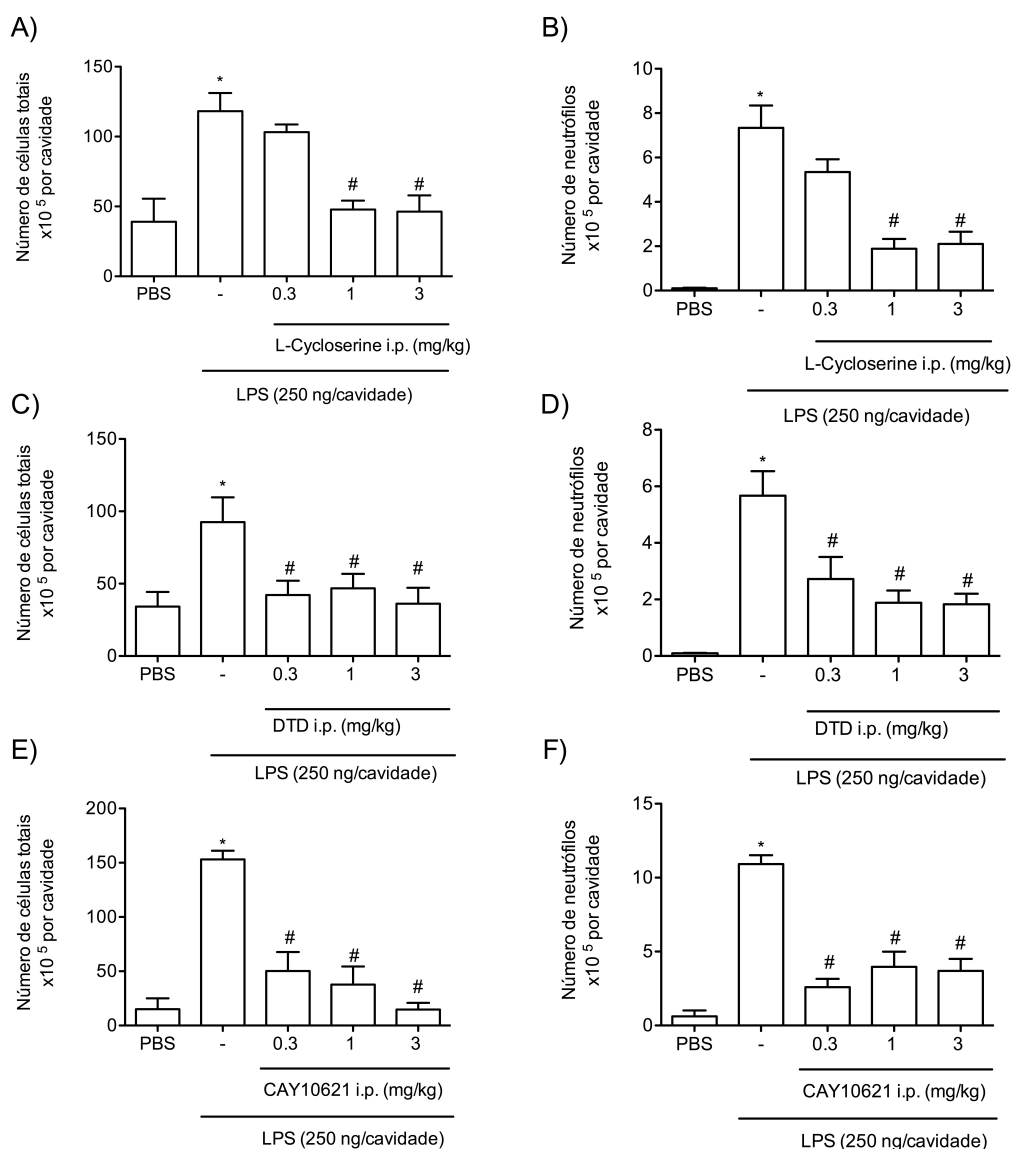


Figura 12 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina na inflamação pleural induzida por LPS. Os animais foram tratados 4 horas após o desafio com L-Cycloserine, DTD e CAY10621, inibidores da via da esfingosina. Após mais 4 horas células foram coletadas por lavado pleural e o número total de células (A, C e E) e o número de neutrófilos (B, D e F) foram analisados. Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. *p < 0,05 quando comparados ao grupo que recebeu PBS intrapleural; # p < 0,05 quando comparados ao

grupo que recebeu somente LPS intrapleural. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

5.3.2 – Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores de S1P: FTY720, JTE013 e CAY10444 na inflamação pleural induzida por LPS.

Uma vez detectado um aumento da expressão dos receptores de esfingosina 1-fosfato durante a resposta inflamatória e verificado que a inibição da produção dos metabolitos dessa via diminuem o acúmulo de neutrófilos, o próximo passo foi avaliar se o tratamento dos animais com FTY720 (antagonista funcional de todos os receptores de S1P), JTE013 (antagonista do receptor 2) e CAY10444 (antagonista do receptor 3), resultaria no mesmo fenótipo. O tratamento dos animais com um processo inflamatório já estabelecido (4h após desafio com LPS), com os antagonistas dos receptores de S1P, diminuiu o acúmulo de células totais (Figura 13A, C e E) e de neutrófilos (Figura 13B, D e F) na cavidade pleural induzido pelo LPS em todas as doses testadas. Não houve alteração quantitativa nas células mononucleadas encontradas em todos os grupos analisados.

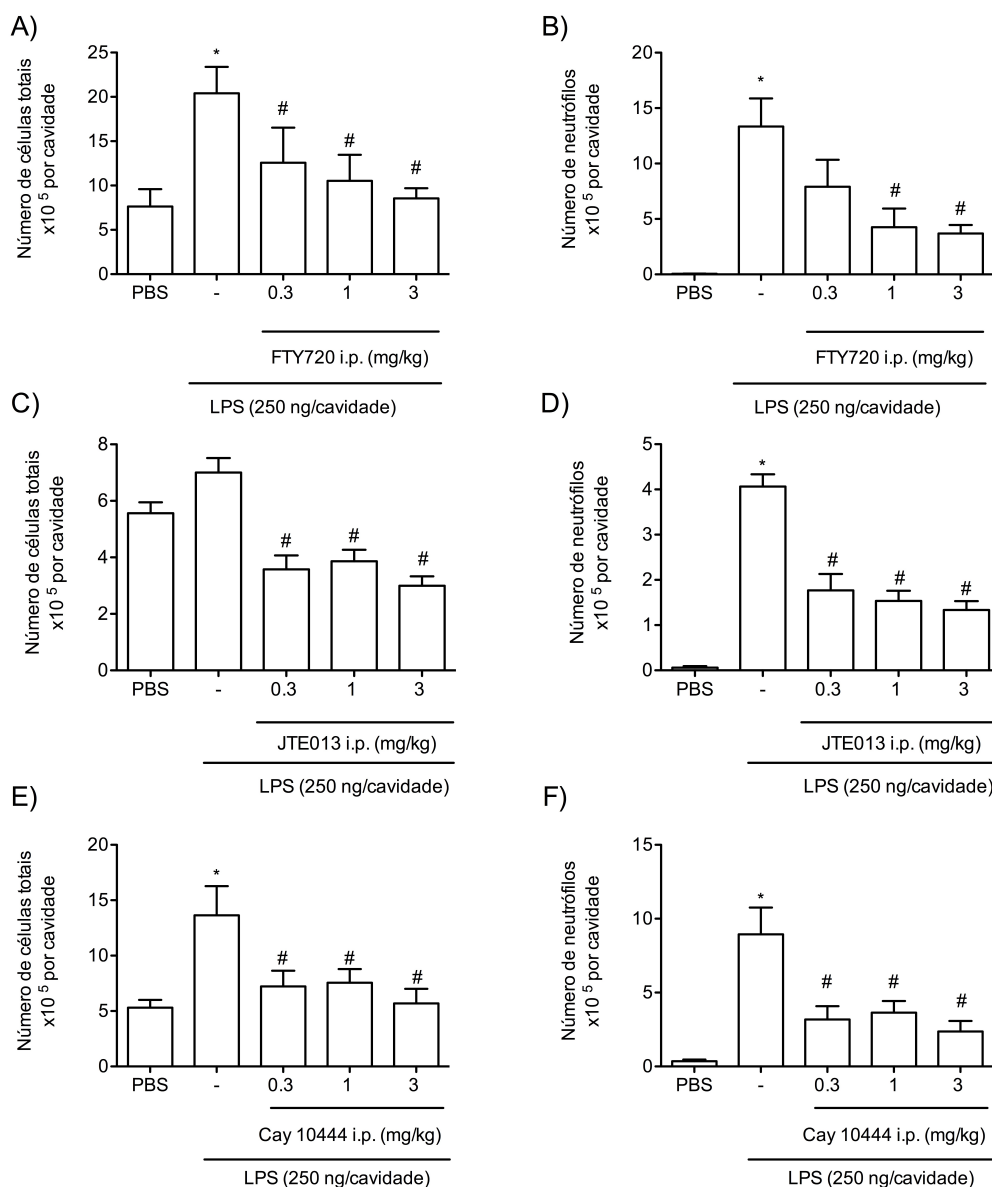


Figura 13 – Efeito da administração dos antagonistas dos receptores de esfingosina-1-fosfato na inflamação pleural por LPS. Os animais foram tratados 4 horas após o desafio com FTY720, JTE013 e CAY10444, inibidores da via da esfingosina. Após mais 4 horas células foram coletadas por lavado pleural e o número total de células (A, C e E) e o número de neutrófilos (B, D e F) foram analisados. Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu PBS intrapleural; # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu somente LPS intrapleural. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

5.3.3 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de SIP na apoptose de neutrófilos.

Como podemos observar, nos resultados mostrados anteriormente, houve uma drástica diminuição na quantidade de neutrófilos na cavidade pleural dos animais, que foram tratados com as diferentes drogas que interferem na via metabólica da esfingosina. Os leucócitos podem ser eliminados do sítio inflamatório por recirculação sistêmica, circulação linfática e por morte celular. Entretanto a principal via de retorno à homeostase de um sítio inflamatório é a indução de apoptose nos leucócitos, seguida de sua eliminação por macrófagos (Frasch and Bratton, 2012; Serhan et al., 2007). Assim, avaliamos se a inibição da via da esfingosina poderia induzir apoptose nos neutrófilos e se esse era o mecanismo envolvido na diminuição do acúmulo dessas células na pleura.

O tratamento com L-Cycloserine e DTD induziu a apoptose de neutrófilos, caracterizada pela análise morfológica em todas as doses mostradas (Figuras 14A e B; Figura 15C e D). CAY10621 aumentou a apoptose de neutrófilos nas doses de 0,3 e 3,0 mg/kg (Figuras 14C; Figura 15E). Além disso, o tratamento com FTY720 e JTE013 também aumentaram a apoptose de neutrófilos somente na dose de 3,0 mg/kg (Figuras 14D e E; Figura 15F e G). CAY10444 induziu um aumento na apoptose de neutrófilos em todas as doses testadas (Figuras 14F; Figura 15H). Todos esses dados corroboram com os resultados de diminuição do acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural. Esse aumento de apoptose pode justificar a diminuição do acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural 8h após a injeção de LPS.

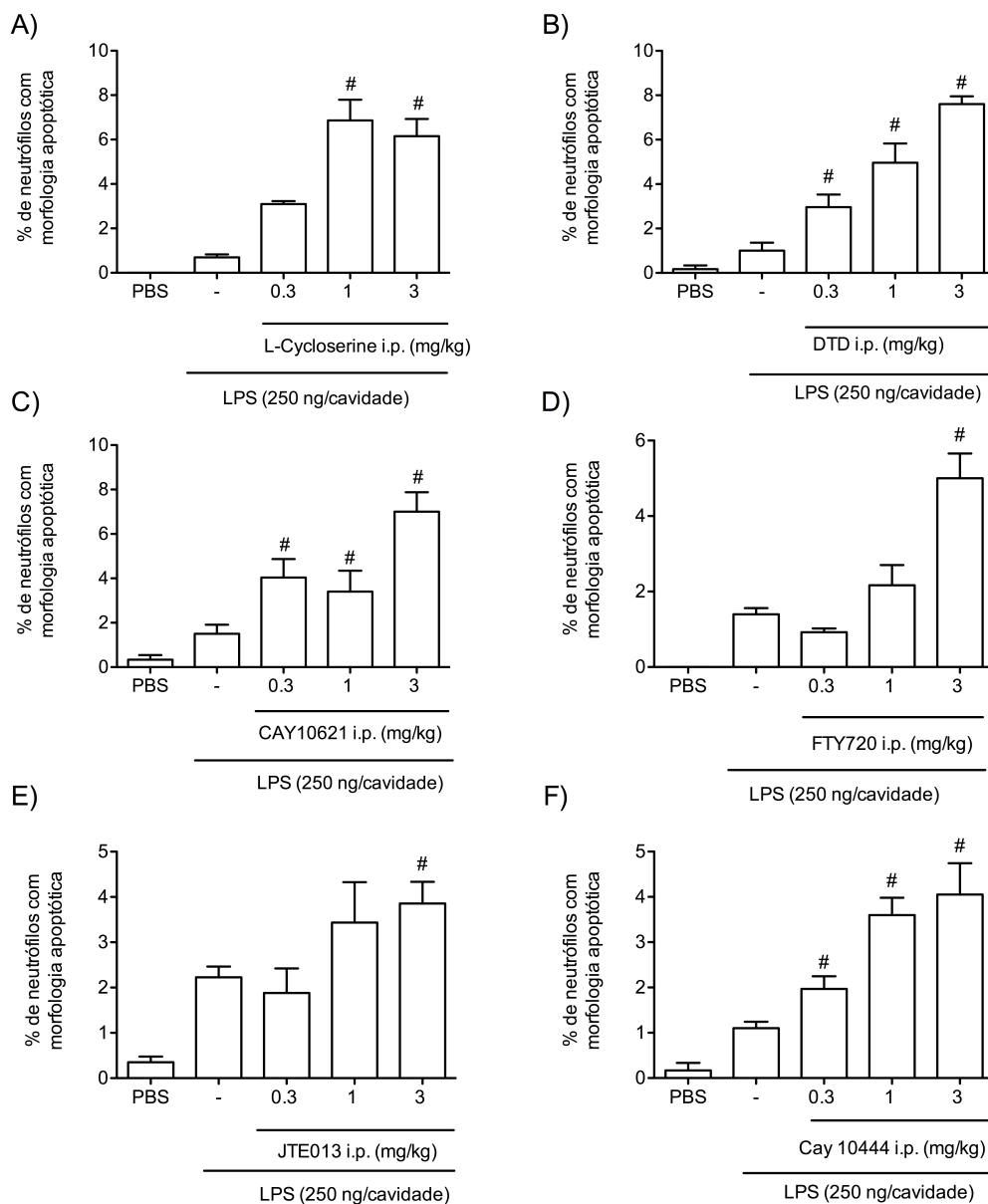


Figura 14 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos na cavidade pleural. Os animais foram tratados 4 horas após o desafio com L-Cycloserine, DTD, CAY10621, FTY720, JTE013 e CAY10444, inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de SIP. Após mais 4 horas células foram coletadas por lavado pleural e a porcentagem de neutrófilos apoptóticos foram analisados. Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu PBS intrapleural; [#] $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu somente LPS intrapleural. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

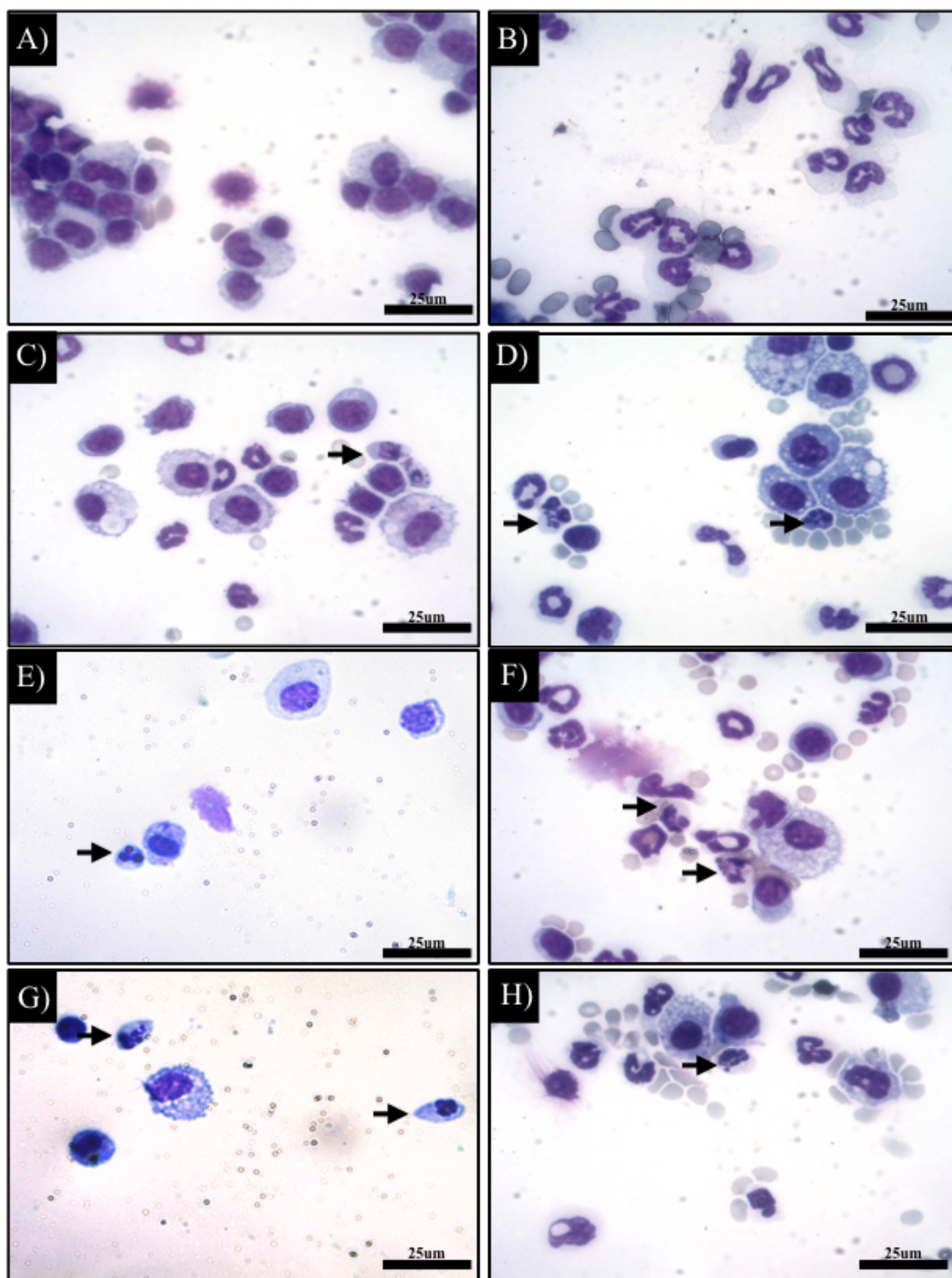


Figura 15 – Características morfológicas das células do lavado pleural após tratamento com os inibidores da via da esfingosina e os antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos na cavidade pleural. Os animais foram tratados 4 horas após o desafio com L-Cycloserine, DTD, CAY10621, FTY720, JTE013 e CAY10444, inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P. Após mais 4 horas células foram coletadas por lavado pleural e a porcentagem de neutrófilos apoptóticos foram analisados. Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. As imagens foram geradas em objetivas de 40x. As setas destacam neutrófilos apoptóticos. Barras de escala representam 25 µm.

5.3.3.1 – Efeito do tratamento prévio com um pan inibidor de caspases (Z-VAD-FMK) sobre a apoptose de neutrófilos murinos causada pelos inibidores e antagonistas dos receptores de S1P.

Na tentativa de elucidarmos o mecanismo pelo qual os inibidores da via de S1P e os antagonistas de S1P, estimulam a apoptose de neutrófilos na cavidade pleural de murinos, utilizamos uma estratégia farmacológica amplamente usada que é o pré-tratamento com Z-VAD-FMK (Sousa et al., 2010; Vago et al., 2012) uma droga pan-inibidora de caspases. Em 2014, Segawa e colaboradores elucidaram a grande associação das caspases com a apoptose seguida de eferocitose, além de ser uma peça chave durante a morte celular programada, as caspases são responsáveis pela exposição da fosfatidilserina na membrana celular, facilitando a fagocitose dessas células (Segawa et al., 2014). Assim, utilizamos o desenho experimental apresentado na Figura 16A.

O tratamento prévio com Z-VAD-FMK, foi capaz de reverter a apoptose causada pelos tratamentos com L-Cycloserine, DTD e JTE013, ambos na dosagem de 3mg/kg. O que indica que o mecanismo envolvido com os dois eventos resolutivos em nosso trabalho (apoptose e eferocitose) seja mediado por caspases – Figura 16B, C e D.

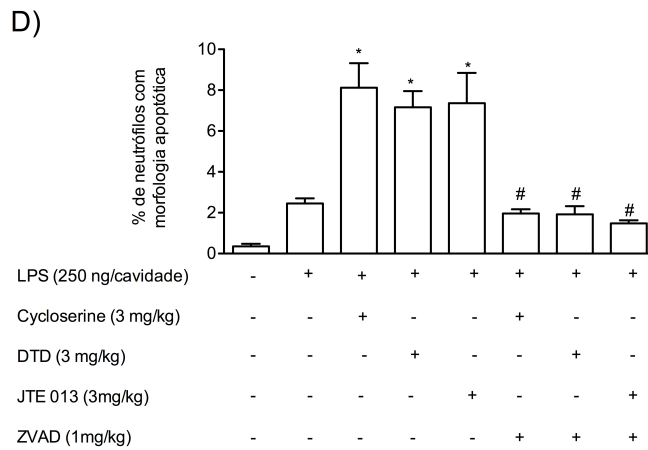
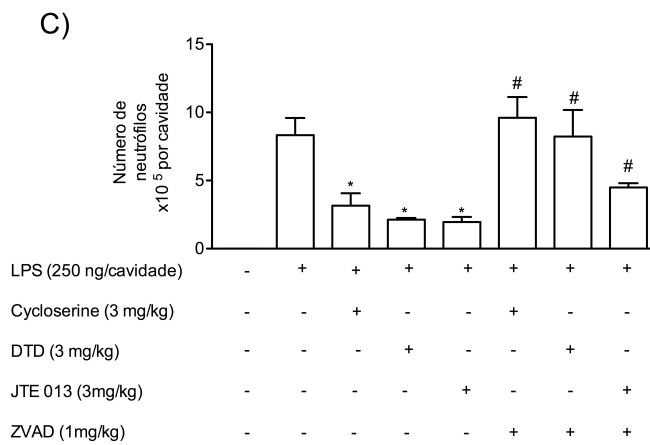
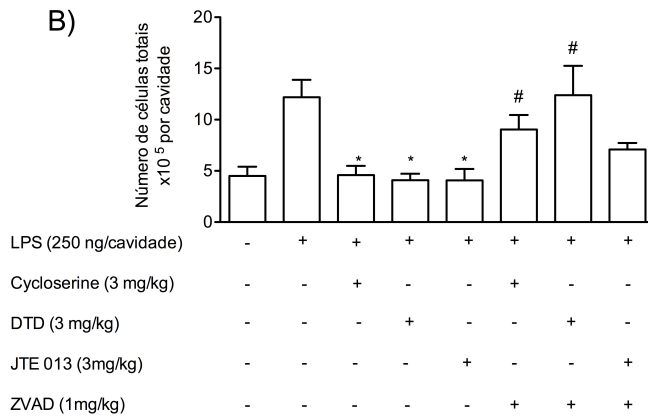
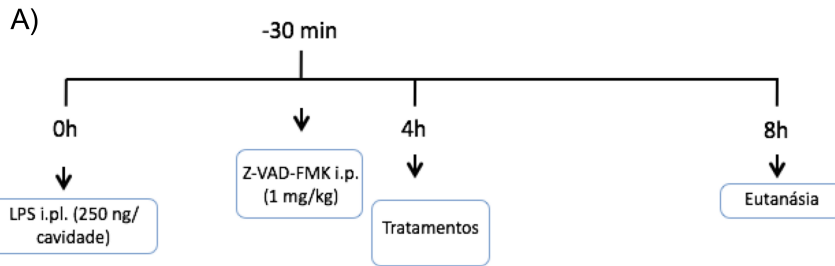


Figura 16 - Efeito da administração de Z-VAD-FMK nos tratamentos utilizando inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na nas células da cavidade pleural. Os animais foram tratados 4 horas após o desafio com L-Cycloserine, DTD, CAY10621, FTY720, JTE013 e CAY10444, inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de SIP. 30 minutos antes dos tratamentos os animais receberam uma injeção de Z-VAD-FMK i.p. (1 mg/kg). Após mais 4 horas células foram coletadas por lavado pleural e o número total de células (B), o número de neutrófilos (C) e a porcentagem de neutrófilos apoptóticos foram analisados (D). Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu LPS intrapleural; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos que receberam somente os seus respectivos tratamentos i.p. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

5.3.4 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de SIP na eferocitose de células apoptóticas na cavidade pleural.

O aumento de apoptose nos levou a outro questionamento: a interferência na via da esfingosina afetaria outro parâmetro da resolução da resposta inflamatória, a eferocitose? De acordo com a literatura, a remoção imediata e eficiente de células apoptóticas por eferocitose é crucial para evitar a perda da integridade celular da célula apoptótica e extravasamento do conteúdo intracelular e por limitar as respostas imunes contra auto-antígenos derivados dessas células (Elliott and Ravichandran, 2010; Ortega-Gomez et al., 2013; Ravichandran and Lorenz, 2007).

Todas as drogas utilizadas aumentaram a eferocitose de neutrófilos apoptóticos, o que pode contribuir para um processo de resolução mais eficaz. L-Cycloserine, CAY10621 e JTE013 foram eficientes nas doses de 1 e 3 mg/kg – Figura 17A, C e E. DTD, FTY720 e CAY10444 foram eficazes somente na dose mais alta (3 mg/kg) - Figura 17B, D e F. Dessa forma a modulação da via da esfingosina se mostra de grande importância em dois eventos que marcam a resolução da resposta inflamatória: a apoptose de neutrófilos seguido pela sua remoção por eferocitose.

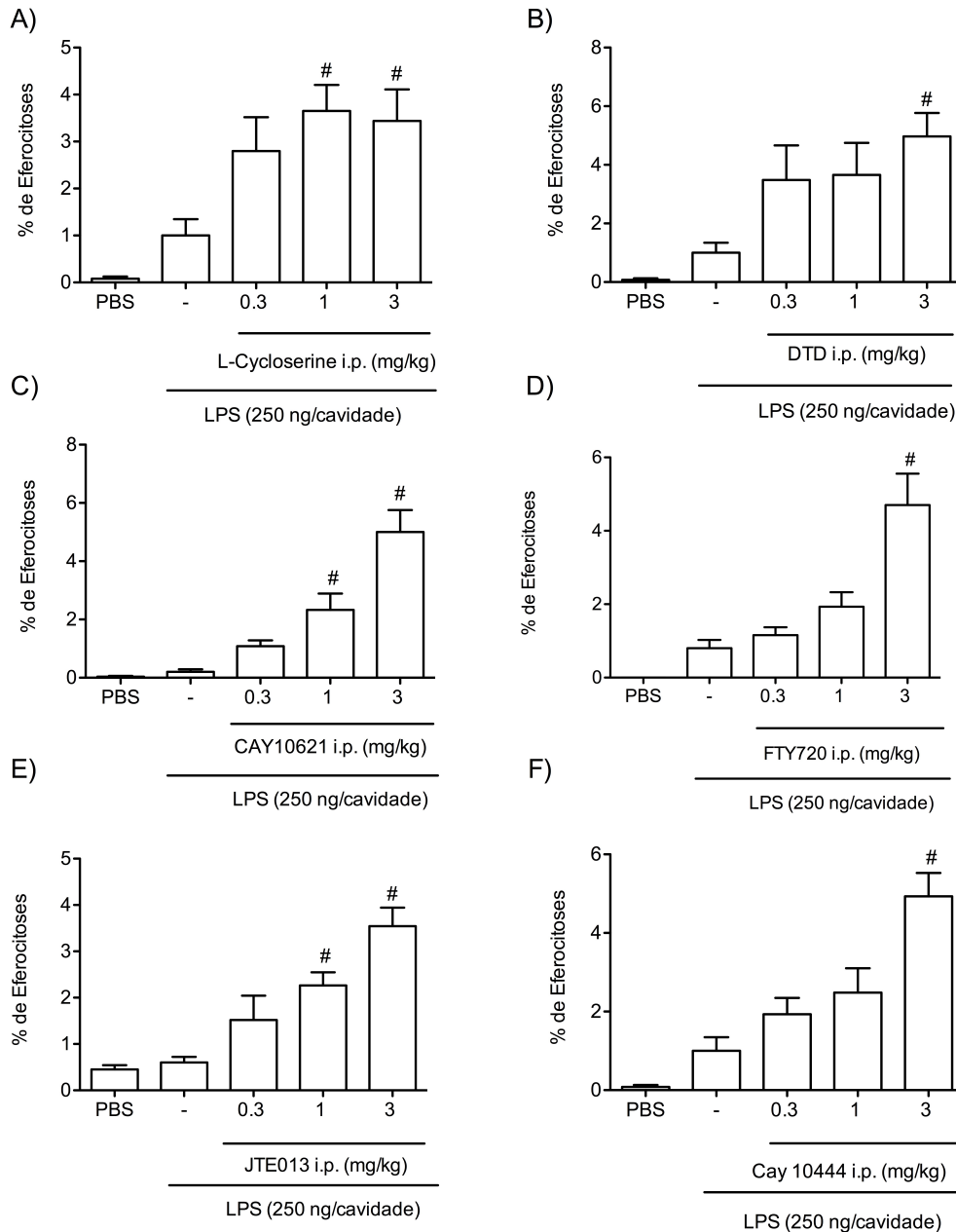


Figura 17 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na eferocitose de leucócitos na cavidade pleural. Os animais foram tratados 4 horas após o desafio com L-Cycloserine, DTD, CAY10621, FTY720, JTE013 e CAY10444, inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P. Após mais 4 horas células foram coletadas por lavado pleural e a porcentagem de células mononucleares com morfologia eferocítica foram analisados. Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu PBS intrapleural; # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu somente LPS intrapleural. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

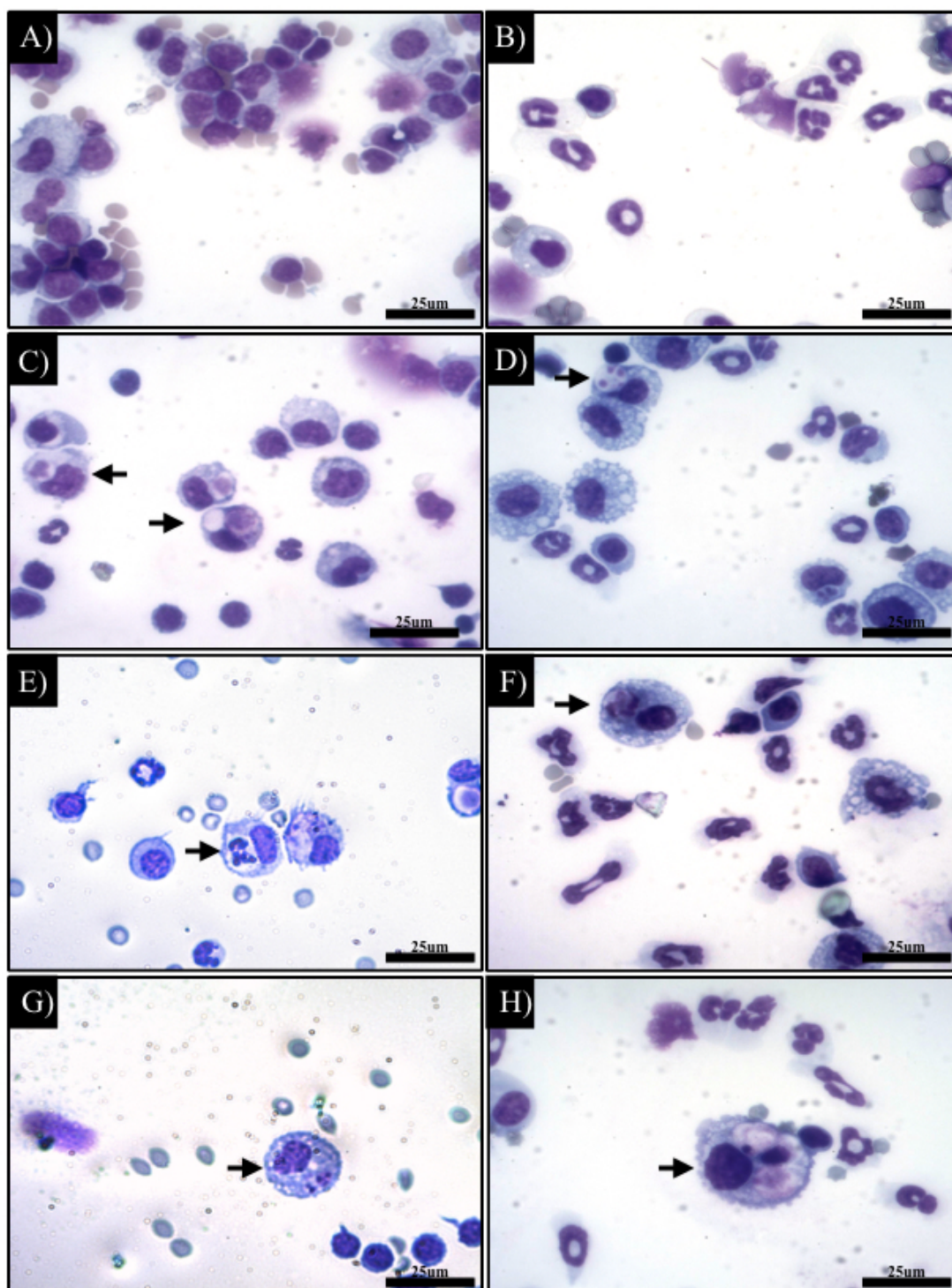


Figura 18 – Características morfológicas das células do lavado pleural após tratamento com os inibidores da via da esfingosina e os antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos na cavidade pleural. Os animais foram tratados 4 horas após o desafio com L-Cycloserine, DTD, CAY10621, FTY720, JTE013 e CAY10444, inibidores da via da esfingosina e anatonistas dos receptores de S1P. Após mais 4 horas células foram coletadas por lavado pleural e a porcentagem de células mononucleares com morfologia eferocítica foram analisados. Os animais que receberam somente PBS no desafio foram considerados como grupo controle. As imagens foram geradas em objetiva de 40x. As setas destacam as eferocitoses. Barras de escala representam 25 µm.

5.4 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P na apoptose de neutrófilos humano.

Até o momento podemos perceber que todos os tratamentos foram eficazes em aumentar a apoptose de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos e também aumentar a eferocitose na mesma. Com o intuito de avaliarmos se o efeito das drogas utilizadas se estendia também a indução de apoptose de neutrófilos humanos, testamos as drogas nessas células – Figura 19A.

Neutrófilos humanos estimulados *in vitro* com L-Cycloserine e CAY10444 por 6h apresentaram um aumento de apoptose nas concentrações de 1 e 10 μM quando comparada com as células não tratadas – Figura 19B e G. Já as células que receberam o tratamento com DTD, CAY10621, FTY720 e JTE013 sofreram apoptose somente quando a concentração estava a 10 μM – Figura 19C, D, E e F .

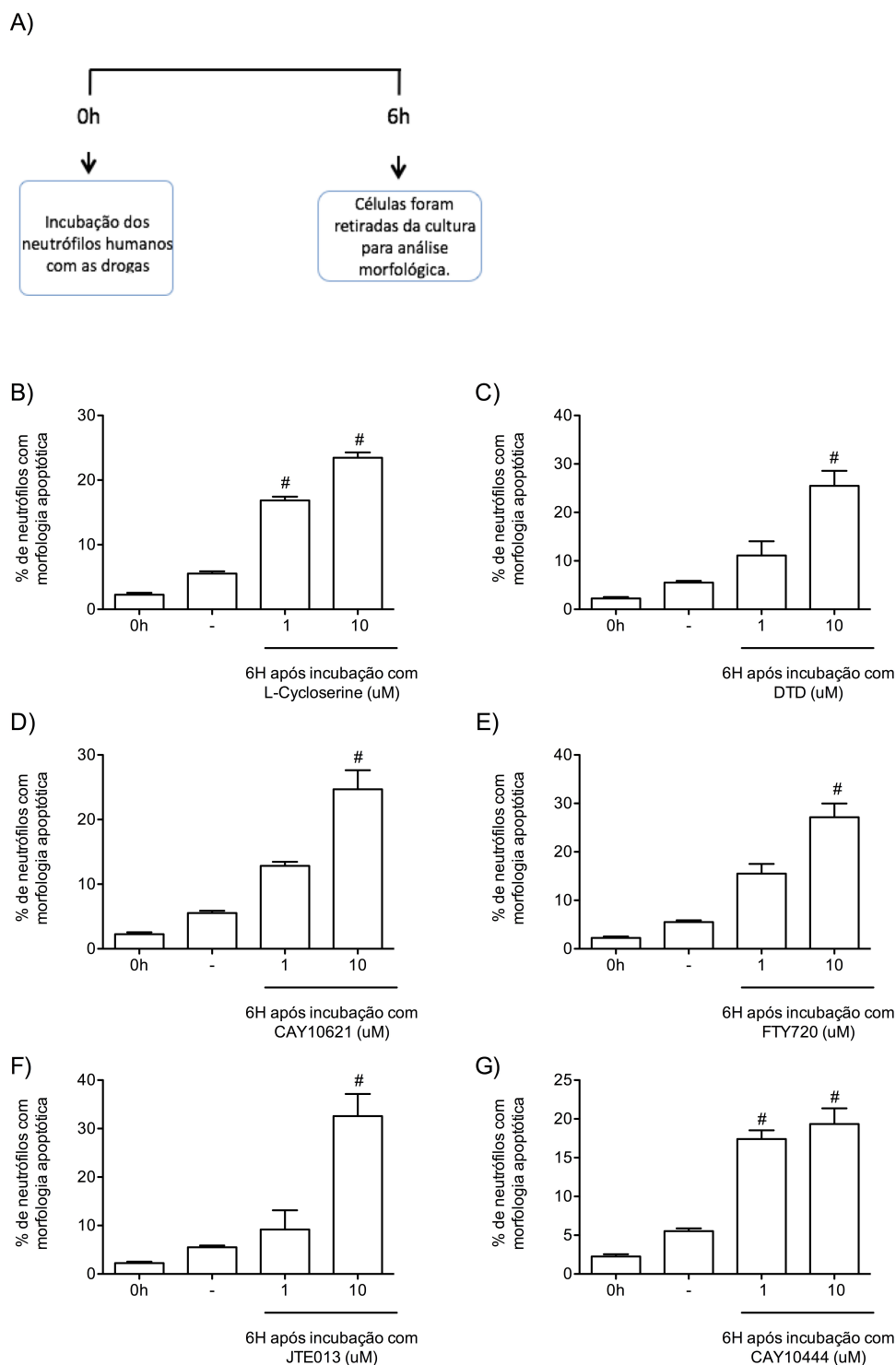


Figura 19 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de neutrófilos de sangue humano. L-Cycloserine, DTD, CAY10621, FTY720, JTE013 e CAY10444 (1 e 10uM) foram administrados em neutrófilos isolados de sangue humano periférico, 6 h após a incubação, as células foram coletadas e armazenadas para análise morfológica. As células que não receberam tratamento foram consideradas como grupo controle. A) Estratégia experimental. B) Células tratadas com L-Cycloserine; C) Células tratadas com DTD; D) Células tratadas com CAY10621; E) Células tratadas com FTY720; F) Células tratadas com JTE013 e G) Células tratadas com CAY10444. * $p < 0,05$ quando comparados as células que não receberam tratamento. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

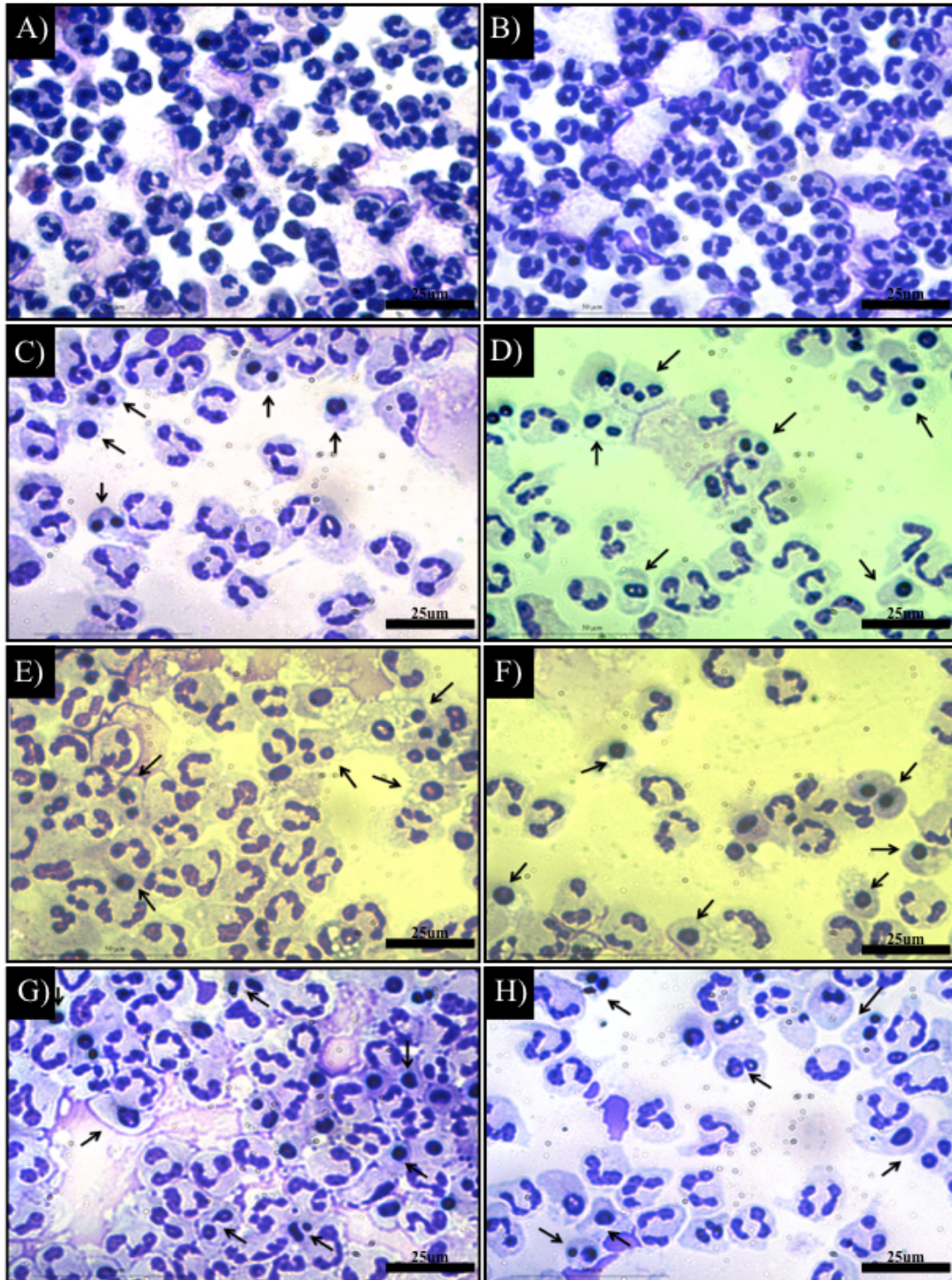


Figura 20 – Características morfológicas dos neutrófilos humanos após tratamento com os inibidores da via da esfingosina e os antagonistas dos receptores de esfingosina 1-fosfato. L-Cycloserine, DTD, CAY10621, FTY720, JTE013 e CAY10444 (10 μ m) foram administrados em neutrófilos isolados de sangue humano periférico, 6 h após a incubação, as células foram coletadas e armazenadas para análise morfológica. As células que não receberam tratamento foram consideradas como grupo controle. A) Células sem tratamento no tempo de 0h; B) Células sem tratamento no tempo de 6h (grupo controle); C) Células tratadas com L-Cycloserine; D) Células tratadas com DTD; E) Células tratadas com CAY10621; F) Células tratadas com FTY720; G) Células tratadas com JTE013 e H) Células tratadas com CAY10444. As imagens foram geradas em objetiva de 40x. As setas destacam neutrófilos apoptóticos. Barras de escala representam 25 μ m. (n=3).

5.5 – Efeito do tratamento com o esfingosina 1-fosfato no recrutamento e na sobrevivência de neutrófilos.

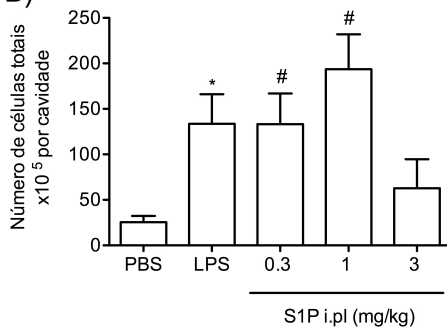
O próximo passo foi confirmar se a via da esfingosina seria realmente importante para a sobrevivência de neutrófilos. Para isso, fizemos um experimento para testar se S1P como pode ser observado no desenho experimental delineado na Figura 21A. poderia ser uma molécula pró-inflamatória, uma característica de várias moléculas (citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos) que aumentam ou mantêm a sobrevivência de leucócitos em sítios inflamatórios.

Podemos observar nos animais que receberam PBS o número de células totais foi bem inferior aos animais que receberam LPS ou S1P, em todas as administradas – Figura 21B. Já os animais que receberam LPS e S1P apresentaram um número de células totais (Figura 21B), mononucleares (Figura 21C) e neutrófilos (Figura 21D) bem semelhantes. Assim, a S1P se mostrou uma molécula capaz de induzir inflamação no local administrado, recrutando o mesmo perfil de células para o local estimulado quando comparado com o LPS. S1P por sua vez se torna um alvo passível de modulação em modelos experimentais de inflamação.

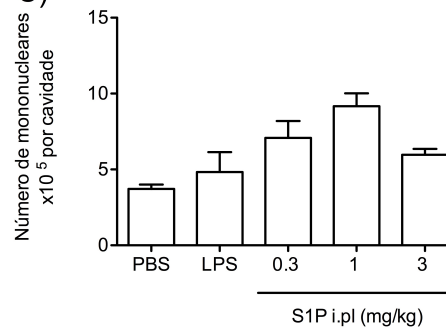
A)



B)



C)



D)

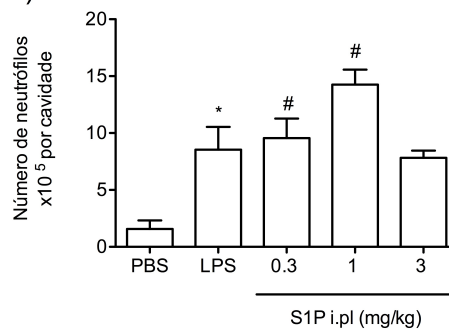


Figura 21 – Avaliação do acúmulo de leucócitos na pleura 8 horas após a administração de S1P. LPS (250 ng/cavidade) e S1P (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg) foram administrados separadamente na cavidade pleural e após 8h, as células foram coletadas, através do lavado pleural, para avaliação quantitativa e qualitativa dos leucócitos por caracterização morfológica. O grupo controle recebeu PBS. A) Estratégia experimental; B) Número total de células por cavidade, C) Número de células mononucleares por cavidade, D) Número de neutrófilos por cavidade. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu PBS intrapleural. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

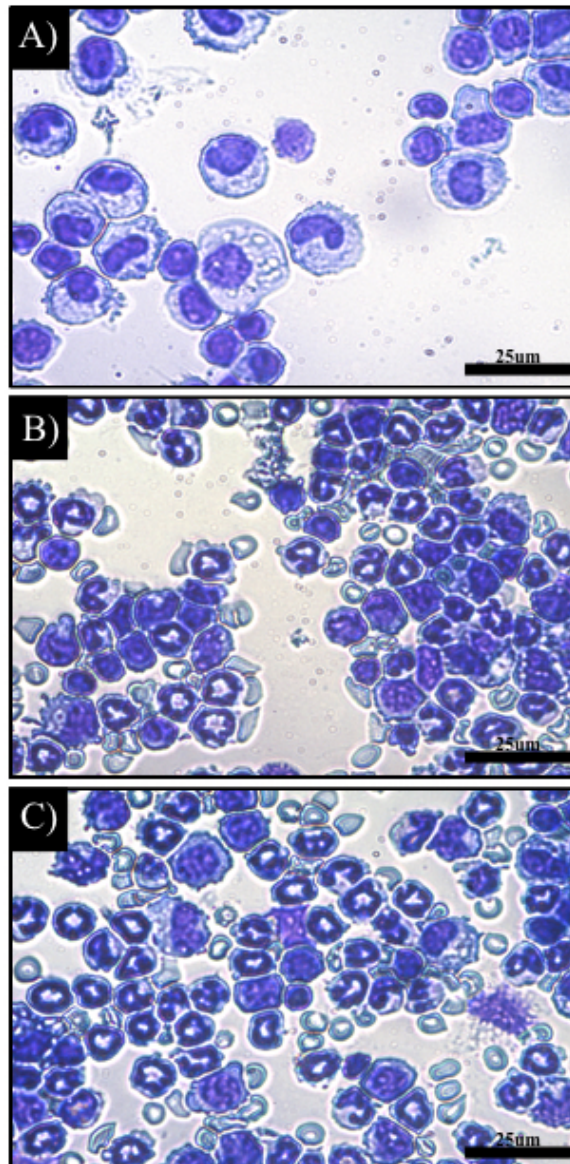
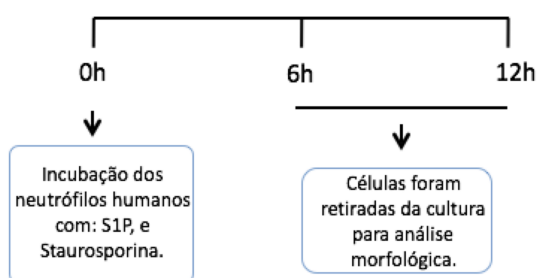


Figura 22 – Características morfológicas das células do lavado pleural após tratamento com S1P. LPS (250 ng/cavidade) e S1P (0,3 mg/kg) foram administrados separadamente na cavidade pleural e após 8h, as células foram coletadas, através do lavado pleural, para avaliação quantitativa e qualitativa dos leucócitos por caracterização morfológica. O grupo controle recebeu PBS. As imagens foram geradas em objetiva de 40x. Barras de escala representam 25 µm.

Além disso, incubamos neutrófilos humanos com esfingosina-1-fosfato. A staurosporina, um indutor de apoptose dependente ou não de caspases (Belmokhtar et al., 2001), foi utilizada como controle positivo. Foi feita uma padronização da dosagem de staurosporina (dados não mostrados).

Podemos perceber que nas seis primeiras horas, S1P diminuiu a porcentagem de neutrófilos apoptóticos em comparação ao grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento – Figura 23B. Após 12h esse comportamento não se manteve. Já as células tratadas com staurosporina tiveram uma taxa de 100% de apoptose em ambos os tempos.

A)



B)

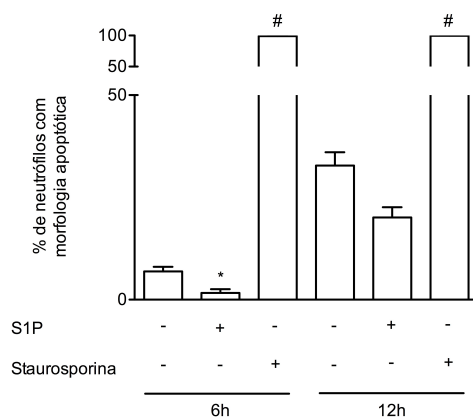


Figura 23 – Efeito da administração de esfingosina 1-fosfato e staurosporina na sobrevivência de neutrófilos de sangue humano. S1P (10 μ m) e staurosporina (1 μ m) foram administrados separadamente em neutrófilos humanos isolados de sangue periférico e após 6h e 12h, as células foram coletadas para caracterização morfológica. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento. A) Estratégia experimental; B) porcentagem de neutrófilos com morfologia apoptótica. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=3).

5.6 – Efeito do tratamento com os inibidores da via da esfingosina e antagonistas dos receptores de S1P na apoptose de macrófagos murinos.

Até o dado momento, podemos perceber que a modulação da via da esfingosina interfere na sobrevivência de neutrófilos tanto murinos quanto humanos. Além dos neutrófilos, outra célula muito importante no processo inflamatório e na resolução da inflamação é o macrófago (Soehnlein and Lindbom, 2010) devido à produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, além de ser um fagócito importante na realização da eferocitose (Ariel and Serhan, 2012; Ravichandran and Lorenz, 2007). Observamos nos nossos experimentos *in vivo* que o efeito dos inibidores utilizados não afetava o número de mononucleares na cavidade pleural, sugerindo assim que o efeito pró-apoptótico da inibição da via da esfingosina e da sua ligação com seus receptores seja célula-específico. De fato, este é um efeito altamente desejável para estratégias pró-resolutivas, uma vez que organismo teria número suficiente de macrófagos para o *clearance* dos neutrófilos apoptóticos. De fato, o próximo passo foi verificar se os tratamentos com inibidores da via da esfingosina e os antagonistas de seus receptores interferiam na sobrevivência dos macrófagos. Para isso os macrófagos retirados da cavidade peritoneal de camundongos foram incubados com as seguintes drogas: L-Cycloserine, DL-threo-dihydrosphingosine (DTD), JTE013, Cay10444, todos na concentração de 10 μM e estaurosporina na concentração de 1 μM , como controle positivo. Quatorze horas após incubação com as diferentes drogas, as células foram marcadas com anexina-V e analisadas por citometria de fluxo – Figura 24A. Corroborando nossos dados *in vivo*, nenhuma das drogas avaliadas interferiram na apoptose dessas células *in vitro*. A staurosporina aumentou a marcação com anexina-V mostrando que essas células

foram susceptíveis a morte celular por apoptose nas condições utilizadas – Figura 24B.

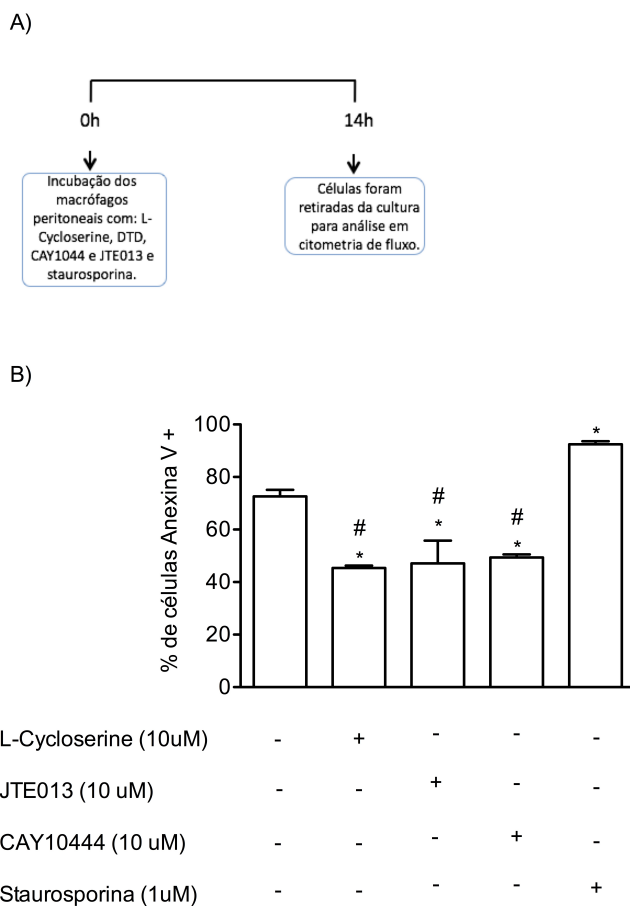
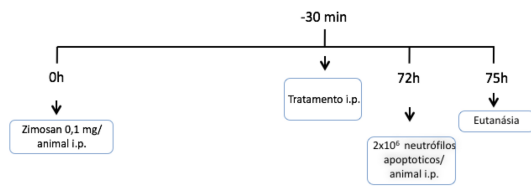


Figura 24 – Efeito da administração dos inibidores da via da esfingosina e dos moduladores dos receptores de esfingosina 1-fosfato na apoptose de macrófagos peritoneais. L-Cycloserine, DL-threo-dihydrospingosine (DTD), JTE013, Cay 10444 (10 μ M) e staurosporina (1 μ M) foram administrados separadamente em macrófagos murinos isolados da cavidade peritoneal previamente estimulada com zimozan (1 mg/kg) e após 14h, as células foram coletadas para análise bioquímica. As células controle não receberam nenhum tratamento. A) Estratégia experimental; B) porcentagem de macrófagos positivos para anexina V. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da media. (n=3).

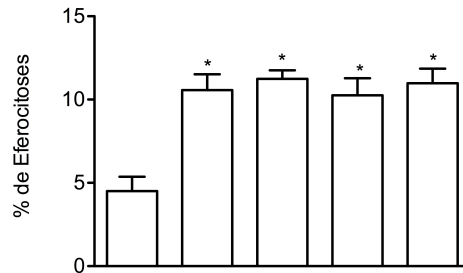
5.7 – Efeito do tratamento com L-cycloserine, DTD, JTE013 e CAY10444 na capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais.

Uma vez que os tratamentos com os inibidores da via da esfingosina e os antagonistas dos seus receptores foram capazes de aumentar a apoptose de neutrófilos e também de aumentar a eferocitose destas células *in vivo*, não interferindo na sobrevivência de macrófagos, o próximo passo foi verificar se os inibidores poderiam induzir eferocitose de neutrófilos apoptóticos (ou melhor, atuar na capacitação/função dos macrófagos) no sítio inflamatório. Para tal, foi utilizando uma outra abordagem experimental específica para avaliar a eferocitose. Para isso, camundongos receberam uma injeção de zimosan via i.p. (0,1 mg/animal), setenta e duas horas após o estímulo os animais receberam também por via peritoneal, neutrófilos apoptóticos e foram eutanasiados três horas após a injeção das células, e coletado o lavado peritoneal para análise morfológica. Para comprovar a eficácia dos tratamentos na atividade eferocítica dos macrófagos, trinta minutos antes dos animais receberam as células apoptóticas, os mesmos foram tratados L-Cycloserine (10 mg/kg i.p.); DTD (3 mg/kg i.p.); JTE013 (3 mg/kg i.p.) e CAY10444 (3 mg/kg i.p.). O tratamento com: L-Cycloserine, DTD, JTE013 e CAY10444 não prejudicou a eferocitose de células apoptóticas e induziram um aumento na capacidade eferocítica dessas células (Figura 25B). Esses resultados corroboram com os dados anteriores que demonstram que a inibição da via da S1P e sua ligação com seus receptores tem efeito pró-resolutivo.

A)



B)



L-Cycloserine (10mg/kg i.p.)	-	+	-	-	-
DTD (3mg/kg i.p.)	-	-	+	-	-
JTE013 (3mg/kg i.p.)	-	-	-	+	-
CAY10444 (3mg/kg i.p.)	-	-	-	-	+
Neutrófilos Apoptóticos (Staurosporina 10um)	+	+	+	+	+

Dia 0 - Zimosan (0,1 mg i.p.)

Figura 25 – Efeito da L-Cycloserine, DTD, JTE013 e CAY 10444 na capacidade eferocítica de macrófagos peritoneais. Animais receberam zimosan i.p. (0,1 mg/animal) e 72 horas após foi administrado 2×10^6 neutrófilos apoptóticos intraperitonealmente. L-Cycloserine (10 mg/kg i.p.), DTD (3 mg/kg), JTE013 (3 mg/kg) ou CAY 10444 (3 mg/kg) foram injetados (i.p.) 30 minutos antes das células apoptóticas. 3h após a injeção dos neutrófilos apoptóticos os animais foram eutanasiados e as células peritoneais recolhidas, via lavado peritoneal, para análise morfológica. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo que recebeu somente neutrófilos apoptóticos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. (n=6).

6. – DISCUSSÃO

No processo inflamatório, para que haja um mínimo de dano tecidual um programa de resolução precisa ser ativado. Assim, o entendimento das moléculas específicas envolvidas na permanência de leucócitos no tecido é de grande interesse para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de interferir na resposta inflamatória. Aqui, sugerimos que a modulação da via da esfingosina, um importante esfingolípido derivado da membrana plasmática, é crucial para a resolução da resposta inflamatória mediada por neutrófilos. Esta idéia é apoiada pelos seguintes achados: a inibição da via metabólica da esfingosina e o bloqueio dos receptores de S1P, no pico da resposta inflamatória: a) diminui o número de neutrófilos na cavidade pleural estimulada com LPS, b) induz apoptose de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* e c) aumenta a capacidade de eferocitose dos macrófagos *in vivo*. Dessa forma, esses dados demonstram que a via metabólica de produção de S1P pode ser crucial na manutenção da sobrevivência de leucócitos em um sítio inflamatório e a manipulação farmacológica dessa via durante uma resposta inflamatória já estabelecida pode gerar eventos pró-resolutivos e cessação da inflamação.

No presente estudo, demonstramos que a inibição de diferentes pontos da via metabólica da esfingosina resultou em uma diminuição da quantidade de neutrófilos na cavidade pleural, com conseqüente aumento de apoptose dessas células utilizando diferentes estratégias de inibição da via intracelular de produção de S1P. Primeiramente, usamos L-Cycloserine, uma droga que inibe a síntese *denovo* de esfingosina, essa estratégia foi eficaz em atenuar a resposta inflamatória induzida por LPS na pleura. Contudo os efeitos pró-apoptóticos alcançados poderiam estar associados com o acúmulo de ceramida na célula. A ceramida é um esfingolípido

bioativo que está envolvido em processos de morte celular como a apoptose, via ativação de caspase-3 e JNK (Lafont et al., 2012; Yabu et al., 2015). Assim, utilizamos outras estratégias farmacológicas que inibem metabólitos abaixo da via, como DL-threo-dihydrospingosine (DTD) e CAY10621, pan inibidor de esfingosina cinase e inibidor de esfingosina cinase 2 respectivamente, gerando o acúmulo de esfingosina intracelular. Ambas as drogas usadas foram eficazes em diminuir o acúmulo de neutrófilos na pleura com subsequente aumento de apoptose e eferocitose das mesmas. Em um trabalho realizado em 2011 por Roviezzo e colaboradores mostrou que, a inibição da via metabólica de esfingolipídios utilizando também entre outros, DTD, diminui o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório com consequente melhora da permeabilidade vascular e atenuação da inflamação aguda na pata de animais induzida por carragenina (Roviezzo et al., 2011). No entanto eventos associados à resolução não foram avaliados nesse estudo. Além disso, foi demonstrado também em 2009, que o bloqueio de S1P, via utilização de DTD diminui a atividade proliferativa de células da retina de ratos (Miranda et al., 2009).

Nossa hipótese é que S1P produzido no sítio de inflamação pode aumentar a sobrevivência de neutrófilos ao ligar-se aos seus receptores transduzindo sinais de sobrevivência intracelular por meio de ativação de PI3K (Bien-Moller et al., 2016). A quantificação de S1P no nosso modelo experimental está sendo realizada. A inibição da produção de S1P ativa um programa de morte celular, a apoptose. A apoptose é um evento relevante no processo resolutivo, eliminando os neutrófilos ativos do local da inflamação com o objetivo de atenuar a resposta inflamatória previamente desencadeada (Jie et al., 2016) e evitar dano adicional aos tecidos quando há liberação de conteúdo tóxico pelos neutrófilos. A apoptose foi confirmada em nosso trabalho pela prévia administração prévia de Z-VAD-FMK, um amplo antagonista de caspases,

nos grupos tratados com inibidores da via metabólica de S1P e antagonistas dos receptores dessa molécula. S1P é um fator de sobrevivência de vários tipos celulares, como células intestinais (Snider et al., 2009), células foliculares (Okamura et al., 2005) e adenocarcinoma de próstata (Pchejetski et al., 2005). Além disso, já foi demonstrado em neutrófilos humanos que o uso de um inibidor de esfingomielinase (Sph-24) e a inibição de esfingosina cinase 2 aumentou a apoptose dessas células (Lin et al., 2011). Diferentes moléculas pró-inflamatórias são importantes para a manutenção da sobrevivência celular como, por exemplo, as citocinas (GM-CSF, IL-5), alguns mediadores lipídicos (Leucotrienos) e LPS (Lucas et al., 2013). Estas são moléculas reconhecidamente pró-inflamatórias e importantes na manutenção da sobrevivência de leucócitos (Cox et al., 1992; Ohd et al., 2000; Yamaguchi et al., 1988). Corroborando com os nossos resultados, a inibição farmacológica de leucotrienos favorece a apoptose de neutrófilos humanos (Viryasova et al., 2016). Embora, não tenhamos investigado os mecanismos intracelulares da indução de apoptose nos neutrófilos pelos tratamentos descritos nesse trabalho, sabemos que as moléculas que estimulam a indução de sobrevivência de leucócitos inibem moléculas intracelulares pró-apoptóticas e ativam moléculas de sobrevivência celular (Perez et al., 2014). Dessa forma, temos como hipótese que o aumento de apoptose pela inibição da via da esfingosina pode estar relacionado com a ativação de moléculas pró-apoptóticas como caspase-3 e moléculas da família Bcl-2 ou com a diminuição da expressão de moléculas de sinalização intracelular importantes para manutenção da sobrevivência celular como o NF- κ B, PI3K, MAPK, entre outras (Alessandri et al., 2011; Lopes et al., 2011; Pinho et al., 2007; Pinho et al., 2005; Reis et al., 2015; Sousa et al., 2009; Sousa et al., 2010). Essas vias de morte e sobrevivência celular serão relevantes de serem

avaliados em experimentos futuros a fim de esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na apoptose induzida pelas drogas utilizadas nesse trabalho.

O eixo S1P – S1PRs (esfingosina 1-fosfato e seus receptores), tem ganhado uma vasta discussão na literatura no contexto vascular e imune. S1P é produzida intracelularmente e exportada para o meio extracelular por um transportador específico Spinster 2 (Spns2) com 12 domínios transmembrânicos que tem uma estrutura similar aos transportadores de glicerol 3-fosfato (Obinata and Hla, 2012). Ao ganhar o meio extracelular a S1P é carregada juntamente com a albumina e o HDL e pode ser ligar a 5 receptores de membrana S1PR1 – S1PR5, induzindo diferentes tipos de resposta celular (Chun et al., 2002; Lee et al., 1998). Nossos dados demonstraram que o LPS aumenta a expressão de S1PR1, 2 e 3 *in vivo* e *in vitro* em camundongos. Sugerindo que os efeitos observados em nosso trabalho são dependentes da produção, secreção e ligação da S1P em seus 3 principais receptores. O receptor 1 (S1PR1) parece estar mais envolvido com a migração de linfócitos para órgão linfóides secundários (Maeda et al., 2015; Pappu et al., 2007). Além disso esse receptor atua na diferenciação desses linfócitos e retenção dos mesmos nos linfonodos (Denton et al., 2014; Liao et al., 2007; Shioh et al., 2006). Por outro lado, o eixo S1P-S1PR2, inibe o recrutamento de células T nas vias aéreas de camundongos no modelo de alergia aguda dependente de mastócitos atenuando a resposta alérgica dos mesmos (Oskeritzian et al., 2015). O receptor 3 ganhou grande destaque em 2000 onde pesquisadores demonstraram a sua importância na quimiotaxia de células CHO – células epiteliais ovarianas, mediada por PI3K γ e Rac (Okamoto et al., 2000). A partir desse marco, muitos trabalhos tentam elucidar esse eixo entre molécula e seus receptores. Em 2013, Keul e colaboradores, demonstraram que o receptor 3 (S1PR3) tem um papel fundamental no recrutamento de macrófagos e monócitos durante a

aterosclerose (Keul et al., 2011). Embora a expressão do receptor 4 (S1PR4) seja exclusiva em células imunes, o seu papel tem sido pouco discutido na literatura, o grupo de pesquisa liderado por Weigert, tem discutido e demonstrado o papel desse receptor na diferenciação e produção de células dendríticas (Dillmann et al., 2015; Dillmann et al., 2016). Já o receptor 5 (S1PR5) é requerido para a migração de células NK. Animais deficientes para S1PR5 mostraram um acúmulo aberrante de células NK nos linfonodos e na medula óssea (Jenne et al., 2009), além de participar na mobilização dessas células para os tecidos inflamados (Walzer et al., 2007). Todos esses dados da literatura em conjunto com os dados obtidos no presente trabalho elucidam ainda mais o papel do eixo S1P-S1PRs no processo inflamatório.

FTY720 é um fármaco amplamente utilizado no controle de esclerose múltipla, a partir de setembro de 2010 após sua aprovação pela FDA, Food and Drug Administration (Cohen et al., 2010; Doggrel, 2010; Kappos et al., 2010). Suas ações parecem envolver dois paradoxais e opostos mecanismos nos receptores de S1P: agonismo e funcional antagonismo de S1PRs (Choi et al., 2011). FTY720 é fosforilado *in vivo* em seu metabólito ativo, o P-FTY720, no qual se liga aos S1PRs agindo como um agonista funcional (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002). No entanto, P-FTY720 também pode agir como um antagonista funcional ligando-se aos receptores de S1P os quais são irreversivelmente internalizados e degradados, ao invés de serem reciclados de volta a superfície celular como ocorre com os ligantes de S1P (Graler and Goetzl, 2004; Oo et al., 2007). A sua eficácia imunológica se deve a ação do P-FTY720 sob o receptor 1 (S1PR1), diminuindo o egresso de linfócitos a partir dos órgãos linfóides inibindo uma lesão do sistema nervoso central causada por linfócitos auto reativos (Chun and Hartung, 2010; Khatri, 2016; Martin, 2010; Schwab and Cyster, 2007). Estudos recentes tem relacionado o papel de FTY720 no

tratamento de alguns tipos de câncer (Kalhori et al., 2016; Zhang et al., 2015). O mecanismo de ação de FTY720 proposto nesses estudos é pela inativação de S1P, considerada anti-apoptótica nesse contexto (Li et al., 2016; White et al., 2016). Nossos resultados corroboram com os trabalhos acima, onde FTY720 se mostrou eficaz em todos os parâmetros analisados. Dessa forma podemos sugerir aqui o reposicionamento do fármaco, o qual poderia ser utilizado como tratamento para doenças inflamatórias agudas, induzindo a resolução desse processo. No entanto, estudos adicionais avaliando o seu efeito em outros modelos experimentais de inflamação serão necessários.

De forma importante, essa via não induz morte de macrófagos e seus efeitos pró-apoptóticos parecem ser seletivos para os neutrófilos. A manutenção dos macrófagos viáveis é de extrema importância para os eventos finais do processo de resolução da resposta inflamatória pois além de secretar citocinas antiinflamatórias, mediadores pró-resolutivos eles são as principais células que fagocitam as células apoptóticas (Alessandri et al., 2013; Bystrom et al., 2008; Dalli and Serhan, 2012; Frasch et al., 2011; Lingen, 2001; Serhan and Savill, 2005; Sugimoto et al., 2016). Em 2013, Xiong e colaboradores, relataram que a via da esfingosina não interfere na atividade de macrófagos inflamatórios. O estudo foi realizado com macrófagos derivados de animais KO para SphK 1 e SphK2, esses macrófagos demonstraram atividade semelhante a macrófagos de animais WT, conservando seu perfil migratório e sua taxa de mortalidade. Além disso, esse trabalho demonstra que a inibição de SphK aumenta o perfil autofágico do macrófago e não interfere na ativação de NFκB nessas células (Xiong et al., 2013). Todos esses dados complementam nossos resultados de que a eferocitose não é modificada durante o processo resolutivo induzido pelas drogas aqui utilizadas, e mais, esse evento celular encontra-se

aumentado após os diferentes tratamentos. A eferocitose é crucial para que a resolução da resposta inflamatória seja eficaz. Esse evento retira as células apoptóticas do sítio inflamatório de forma não flogística (Dalli and Serhan, 2012; Frasnich and Bratton, 2012; Ravichandran and Lorenz, 2007). O macrófago pode variar o seu fenótipo de acordo com a fase do processo inflamatório no qual ele se encontra, sendo que durante a fase resolutive os macrófagos induzidos por IFN γ - M1 da fase produtiva alteram seu fenótipo para M2 (induzidos por IL-4) e posteriormente (Ariel and Serhan, 2012) para Mres (Ariel and Serhan, 2012; Bystrom et al., 2008; Bystrom et al., 2011; Mantovani et al., 2005). Os macrófagos M2 são altamente eferocíticos e após a eferocitose sintetizam e secretam moléculas pró-resolutivas e citocinas anti-inflamatórias conduzindo á resolução eficiente (Vago et al., 2015). M2 é capaz de reconhecer células apoptóticas por interagir com moléculas presentes na superfície de macrófagos como por exemplo, Mer-TK e TIM-4 (Santulli-Marotto et al., 2015). Assim, de forma interessante, temos o como perspectiva, investigar se as drogas aqui utilizadas são capazes de modular o fenótipo dos macrófagos para um perfil pró-resolutivo e alterar a expressão de moléculas de reconhecimento de células apoptóticas para entender o porque que os tratamentos potencializam a capacidade eferocítica dos macrófagos.

Dessa forma, podemos concluir que a via dos esfingolipídios é crucial para o desenvolvimento da resposta inflamatória induzida por LPS. A modulação da via da esfingosina pode ser uma estratégia pró-resolutiva em modelos de inflamação neutrofílica como avaliado, pelo efeito pró-apoptótico e pró-eferocítico das drogas utilizadas. Além disso, essas drogas tiveram um comportamento seletivo, não alterando e potencializando a atividade dos macrófagos, células essenciais para a

finalização do processo inflamatório. Assim, os esfingolipídios se tornam um alvo terapêutico em potencial para resolver doenças inflamatórias neutrofílicas.

7. – CONCLUSÃO

Diante do exposto podemos concluir que a inibição da via metabólica de esfingosina 1-fosfato ou a interferência em seus receptores, se mostrou eficaz na resolução da resposta inflamatória induzida por LPS.

8. – PERSPECTIVAS

Temos como perspectivas futuras para esse trabalho:

- Avaliar quais vias de sinalização estão envolvidas no processo de morte celular, como, diminuição na expressão de vias de sobrevivência celular: NFκB e PI3κ; e aumento de moléculas pró-apoptóticas: caspase 3, Bax e Bad.
- Analisar por metodologia bioquímica (marcação por AnexinaV), a apoptose dos neutrófilos humanos e murinos;
- Analisar o fenótipo dos macrófagos encontrados no lavado pleural após os tratamento com inibidores e antagonistas dos receptores de S1P;
- Mensurar S1P no lavado pleural durante o desafio por LPS;
- Observar o comportamento dos receptores 4 e 5 (S1PR4 e S1PR5) nas células do lavado pleural e em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos.

9. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alessandri, A.L., R. Duffin, A.E. Leitch, C.D. Lucas, T.A. Sheldrake, D.A. Dorward, N. Hirani, V. Pinho, L.P. de Sousa, M.M. Teixeira, J.F. Lyons, C. Haslett, and A.G. Rossi. 2011. Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation. *PLoS one* 6:e25683.
- Alessandri, A.L., L.P. Sousa, C.D. Lucas, A.G. Rossi, V. Pinho, and M.M. Teixeira. 2013. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & therapeutics* 139:189-212.
- Amulic, B., C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, and A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology* 30:459-489.
- Aoki, M., H. Aoki, R. Ramanathan, N.C. Hait, and K. Takabe. 2016. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. *Mediators of inflammation* 2016:8606878.
- 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.
- Baker, D.A., J. Barth, R. Chang, L.M. Obeid, and G.S. Gilkeson. 2010. Genetic sphingosine kinase 1 deficiency significantly decreases synovial inflammation and joint erosions in murine TNF-alpha-induced arthritis. *Journal of immunology* 185:2570-2579.
- Belmokhtar, C.A., J. Hillion, and E. Segal-Bendirdjian. 2001. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20:3354-3362.
- Best, S.M. 2008. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annual review of microbiology* 62:171-192.
- Bien-Moller, S., S. Lange, T. Holm, A. Bohm, H. Paland, J. Kupper, S. Herzog, K. Weitmann, C. Havemann, S. Vogelgesang, S. Marx, W. Hoffmann, H.W. Schroeder, and B.H. Rauch. 2016. Expression of S1P metabolizing enzymes and receptors correlate with survival time and regulate cell migration in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 7:13031-13046.
- Borish, L.C., and J.W. Steinke. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111:S460-475.
- Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33:657-670.
- Brinkmann, V., M.D. Davis, C.E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C.A. Foster, M. Zollinger, and K.R. Lynch. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *The Journal of biological chemistry* 277:21453-21457.
- Buckley, C.D., D.W. Gilroy, and C.N. Serhan. 2014. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity* 40:315-327.
- Burg, N.D., and M.H. Pillinger. 2001. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clinical immunology* 99:7-17.
- Bystrom, J., I. Evans, J. Newson, M. Stables, I. Toor, N. van Rooijen, M. Crawford, P. Colville-Nash, S. Farrow, and D.W. Gilroy. 2008. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 112:4117-4127.
- Bystrom, J., J.A. Wray, M.C. Sugden, M.J. Holness, K.E. Swales, T.D. Warner, M.L. Edin, D.C. Zeldin, D.W. Gilroy, and D. Bishop-Bailey. 2011. Endogenous epoxygenases are modulators of monocyte/macrophage activity. *PLoS One* 6:e26591.

- Carroll, M.C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annual review of immunology* 16:545-568.
- Chiba, K. 2005. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacology & therapeutics* 108:308-319.
- Choi, J.W., S.E. Gardell, D.R. Herr, R. Rivera, C.W. Lee, K. Noguchi, S.T. Teo, Y.C. Yung, M. Lu, G. Kennedy, and J. Chun. 2011. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:751-756.
- Chun, J., E.J. Goetzl, T. Hla, Y. Igarashi, K.R. Lynch, W. Moolenaar, S. Pyne, and G. Tigyi. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54:265-269.
- Chun, J., and H.P. Hartung. 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 33:91-101.
- Chung, K.F. 2012. Inflammatory biomarkers in severe asthma. *Current opinion in pulmonary medicine* 18:35-41.
- Clarke, C.J., T.G. Truong, and Y.A. Hannun. 2007. Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *The Journal of biological chemistry* 282:1384-1396.
- Cohen, J.A., F. Barkhof, G. Comi, H.P. Hartung, B.O. Khatri, X. Montalban, J. Pelletier, R. Capra, P. Gallo, G. Izquierdo, K. Tiel-Wilck, A. de Vera, J. Jin, T. Stites, S. Wu, S. Aradhye, L. Kappos, and T.S. Group. 2010. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362:402-415.
- Cohen, J.J. 1993. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hospital practice* 28:35-43.
- Cory, S., and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer* 2:647-656.
- Cox, G., J. Gauldie, and M. Jordana. 1992. Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 7:507-513.
- Cyster, J.G., and S.R. Schwab. 2012. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual review of immunology* 30:69-94.
- Dalli, J., C.P. Jones, D.M. Cavalcanti, S.H. Farsky, M. Perretti, and S.M. Rankin. 2012. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26:387-396.
- Dalli, J., and C.N. Serhan. 2012. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 120:e60-72.
- Denton, A.E., E.W. Roberts, M.A. Linterman, and D.T. Fearon. 2014. Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:12139-12144.
- Di, A., T. Kawamura, X.P. Gao, H. Tang, E. Berdyshev, S.M. Vogel, Y.Y. Zhao, T. Sharma, K. Bachmaier, J. Xu, and A.B. Malik. 2010. A novel function of sphingosine kinase 1 suppression of JNK activity in preventing inflammation and injury. *The Journal of biological chemistry* 285:15848-15857.
- Dillmann, C., J. Mora, C. Olesch, B. Brune, and A. Weigert. 2015. S1PR4 is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Biol Chem* 396:775-782.

- Dillmann, C., C. Ringel, J. Ringleb, J. Mora, C. Olesch, A.F. Fink, E. Roberts, B. Brune, and A. Weigert. 2016. S1PR4 Signaling Attenuates ILT 7 Internalization To Limit IFN-alpha Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of immunology* 196:1579-1590.
- Dinarello, C.A. 1997. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents* 11:91-103.
- Doggrell, S.A. 2010. Oral fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis Evaluation of: Kappos L, Radue E-M, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:387-401; and Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:402-15. *Expert Opin Pharmacother* 11:1777-1781.
- Duan, W., J.H. Chan, C.H. Wong, B.P. Leung, and W.S. Wong. 2004. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *Journal of immunology* 172:7053-7059.
- Duran-Salgado, M.B., and A.F. Rubio-Guerra. 2014. Diabetic nephropathy and inflammation. *World journal of diabetes* 5:393-398.
- Elliott, M.R., and K.S. Ravichandran. 2010. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *The Journal of cell biology* 189:1059-1070.
- Fialkow, L., Y. Wang, and G.P. Downey. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 42:153-164.
- Frasch, S.C., and D.L. Bratton. 2012. Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation. *Prog Lipid Res* 51:199-207.
- Frasch, S.C., R.F. Fernandez-Boyanapalli, K.Z. Berry, C.C. Leslie, J.V. Bonventre, R.C. Murphy, P.M. Henson, and D.L. Bratton. 2011. Signaling via macrophage G2A enhances efferocytosis of dying neutrophils by augmentation of Rac activity. *The Journal of biological chemistry* 286:12108-12122.
- Fullerton, J.N., A.J. O'Brien, and D.W. Gilroy. 2014. Lipid mediators in immune dysfunction after severe inflammation. *Trends in immunology* 35:12-21.
- Gabay, C., and I. Kushner. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454.
- Gardai, S.J., K.A. McPhillips, S.C. Frasn, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.A. Oldenborg, M. Michalak, and P.M. Henson. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.
- Gautier, E.L., S. Ivanov, P. Lesnik, and G.J. Randolph. 2013. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 122:2714-2722.
- Gilroy, D.W., T. Lawrence, M. Perretti, and A.G. Rossi. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 3:401-416.
- Graeler, M., and E.J. Goetzl. 2002. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16:1874-1878.
- Graler, M.H., and E.J. Goetzl. 2004. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:551-553.
- Gregory, C. 2009. Cell biology: Sent by the scent of death. *Nature* 461:181-182.
- Grimsley, C., and K.S. Ravichandran. 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends in cell biology* 13:648-656.

- Grin'kina, N.M., E.E. Karnabi, D. Damania, S. Wadgaonkar, I.A. Muslimov, and R. Wadgaonkar. 2012. Sphingosine kinase 1 deficiency exacerbates LPS-induced neuroinflammation. *PLoS one* 7:e36475.
- Gupta, V., A. Khan, A. Higham, J. Lemon, S. Sriskantharajah, A. Amour, E.M. Hessel, T. Southworth, and D. Singh. 2016. The effect of phosphatidylinositol-3 kinase inhibition on matrix metalloproteinase-9 and reactive oxygen species release from chronic obstructive pulmonary disease neutrophils. *Int Immunopharmacol* 35:155-162.
- Hannun, Y.A. 1994. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *The Journal of biological chemistry* 269:3125-3128.
- Hannun, Y.A., and L.M. Obeid. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9:139-150.
- Henson, P.M. 2005. Dampening inflammation. *Nature immunology* 6:1179-1181.
- Ho, P.C., D.J. Saville, and S. Wanwimolruk. 2001. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 4:217-227.
- Huwiler, A., and J. Pfeilschifter. 2006. Altering the sphingosine-1-phosphate/ceramide balance: a promising approach for tumor therapy. *Current pharmaceutical design* 12:4625-4635.
- Im, D.S., C.E. Heise, N. Ancellin, B.F. O'Dowd, G.J. Shei, R.P. Heavens, M.R. Rigby, T. Hla, S. Mandala, G. McAllister, S.R. George, and K.R. Lynch. 2000. Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *The Journal of biological chemistry* 275:14281-14286.
- Janicke, R.U., M.L. Sprengart, M.R. Wati, and A.G. Porter. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 273:9357-9360.
- Jenne, C.N., A. Enders, R. Rivera, S.R. Watson, A.J. Bankovich, J.P. Pereira, Y. Xu, C.M. Roots, J.N. Beilke, A. Banerjee, S.L. Reiner, S.A. Miller, A.S. Weinmann, C.C. Goodnow, L.L. Lanier, J.G. Cyster, and J. Chun. 2009. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 206:2469-2481.
- Jhunjunwala, S., D. Alvarez, S. Aresta-DaSilva, K. Tang, B.C. Tang, D.L. Greiner, P.E. Newburger, U.H. von Andrian, R. Langer, and D.G. Anderson. 2016. Splenic progenitors aid in maintaining high neutrophil numbers at sites of sterile chronic inflammation. *Journal of leukocyte biology*
- Jie, H., Y. He, X. Huang, Q. Zhou, Y. Han, X. Li, Y. Bai, and E. Sun. 2016. Necrostatin-1 enhances the resolution of inflammation by specifically inducing neutrophil apoptosis. *Oncotarget*
- Kalhari, V., M. Magnusson, M.Y. Asghar, I. Pulli, and K. Tornquist. 2016. FTY720 (Fingolimod) attenuates basal and sphingosine-1-phosphate-evoked thyroid cancer cell invasion. *Endocr Relat Cancer* 23:457-468.
- Kappos, L., E.W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson, P. Burtin, and F.S. Group. 2010. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362:387-401.
- Katzenstein, A.L., and J.L. Myers. 1998. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1301-1315.

- Keul, P., S. Lucke, K. von Wnuck Lipinski, C. Bode, M. Graler, G. Heusch, and B. Levkau. 2011. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res* 108:314-323.
- Khatri, B.O. 2016. Fingolimod in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: long-term experience and an update on the clinical evidence. *Ther Adv Neurol Disord* 9:130-147.
- Kinchen, J.M., and K.S. Ravichandran. 2008. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9:781-795.
- Kinchen, J.M., and K.S. Ravichandran. 2010. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature* 464:778-782.
- Kolaczowska, E., and P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 13:159-175.
- Kono, H., and K.L. Rock. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews. Immunology* 8:279-289.
- Kono, N., T. Inoue, Y. Yoshida, H. Sato, T. Matsusue, H. Itabe, E. Niki, J. Aoki, and H. Arai. 2008. Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *The Journal of biological chemistry* 283:1628-1636.
- Lafont, E., R. Dupont, N. Andrieu-Abadie, T. Okazaki, K. Schulze-Osthoff, T. Levade, H. Benoist, and B. Segui. 2012. Ordering of ceramide formation and caspase-9 activation in CD95L-induced Jurkat leukemia T cell apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1821:684-693.
- Lahorte, C.M., J.L. Vanderheyden, N. Steinmetz, C. Van de Wiele, R.A. Dierckx, and G. Slegers. 2004. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 31:887-919.
- Lai, W.Q., A.W. Irwan, H.H. Goh, H.S. Howe, D.T. Yu, R. Valle-Onate, I.B. McInnes, A.J. Melendez, and B.P. Leung. 2008. Anti-inflammatory effects of sphingosine kinase modulation in inflammatory arthritis. *Journal of immunology* 181:8010-8017.
- Lawrence, T., and D.W. Gilroy. 2007. Chronic inflammation: a failure of resolution? *International journal of experimental pathology* 88:85-94.
- Lee, M.J., J.R. Van Brocklyn, S. Thangada, C.H. Liu, A.R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, and T. Hla. 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279:1552-1555.
- Leitch, A.E., C.D. Lucas, J.A. Marwick, R. Duffin, C. Haslett, and A.G. Rossi. 2012. Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation. *Cell death and differentiation* 19:1950-1961.
- Li, J., S.W. Wang, D.S. Zhang, Y. Sun, C.Y. Zhu, Q. Fei, J. Hu, C. Zhang, and Y.M. Sun. 2016. FTY720-induced enhancement of autophagy protects cells from FTY720 cytotoxicity in colorectal cancer. *Oncol Rep* 35:2833-2842.
- Liang, J., M. Nagahashi, E.Y. Kim, K.B. Harikumar, A. Yamada, W.C. Huang, N.C. Hait, J.C. Allegood, M.M. Price, D. Avni, K. Takabe, T. Kordula, S. Milstien, and S. Spiegel. 2013. Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 23:107-120.
- Liao, J.J., M.C. Huang, M. Graler, Y. Huang, H. Qiu, and E.J. Goetzl. 2007. Distinctive T cell-suppressive signals from nuclearized type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry* 282:1964-1972.
- Lin, W.C., C.F. Lin, C.L. Chen, C.W. Chen, and Y.S. Lin. 2011. Inhibition of neutrophil apoptosis via sphingolipid signaling in acute lung injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 339:45-53.

- Lingen, M.W. 2001. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of pathology & laboratory medicine* 125:67-71.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lopes, F., F.M. Coelho, V.V. Costa, E.L. Vieira, L.P. Sousa, T.A. Silva, L.Q. Vieira, M.M. Teixeira, and V. Pinho. 2011. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63:2651-2660.
- Lucas, C.D., K.C. Allen, D.A. Dorward, L.J. Hoodless, L.A. Melrose, J.A. Marwick, C.S. Tucker, C. Haslett, R. Duffin, and A.G. Rossi. 2013. Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27:1084-1094.
- Luscinskas, F.W., S. Ma, A. Nusrat, C.A. Parkos, and S.K. Shaw. 2002. Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Seminars in immunology* 14:105-113.
- Maceyka, M., and S. Spiegel. 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510:58-67.
- Maeda, Y., N. Seki, H. Kataoka, K. Takemoto, H. Utsumi, A. Fukunari, K. Sugahara, and K. Chiba. 2015. IL-17-Producing Vgamma4+ gammadelta T Cells Require Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 for Their Egress from the Lymph Nodes under Homeostatic and Inflammatory Conditions. *Journal of immunology* 195:1408-1416.
- Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G.J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C.L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons, and H. Rosen. 2002. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296:346-349.
- Mandhane, S.N., J.H. Shah, and R. Thennati. 2011. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects. *International immunopharmacology* 11:1646-1662.
- Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23:344-346.
- Margolius, H.S. 1995. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension* 26:221-229.
- Marques, R.E., P.E. Marques, R. Guabiraba, and M.M. Teixeira. 2016. Exploring the Homeostatic and Sensory Roles of the Immune System. *Frontiers in immunology* 7:125.
- Martin, R. 2010. Multiple sclerosis: closing in on an oral treatment. *Nature* 464:360-362.
- Mathias, S., L.A. Pena, and R.N. Kolesnick. 1998. Signal transduction of stress via ceramide. *The Biochemical journal* 335 (Pt 3):465-480.
- McFarland, H.F., and R. Martin. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology* 8:913-919.
- Medzhitov, R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140:771-776.
- Melendez, A.J. 2008. Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets. *Biochimica et biophysica acta* 1784:66-75.
- Mendoza, A., B. Breart, W.D. Ramos-Perez, L.A. Pitt, M. Gobert, M. Sunkara, J.J. Lafaille, A.J. Morris, and S.R. Schwab. 2012. The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Rep* 2:1104-1110.
- Merrill, A.H., Jr., E.M. Schmelz, D.L. Dillehay, S. Spiegel, J.A. Shayman, J.J. Schroeder, R.T. Riley, K.A. Voss, and E. Wang. 1997. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicology and applied pharmacology* 142:208-225.

- Michaud, J., M. Kohno, R.L. Proia, and T. Hla. 2006. Normal acute and chronic inflammatory responses in sphingosine kinase 1 knockout mice. *FEBS Lett* 580:4607-4612.
- Miranda, G.E., C.E. Abrahan, L.E. Politi, and N.P. Rotstein. 2009. Sphingosine-1-phosphate is a key regulator of proliferation and differentiation in retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4416-4428.
- Miyoshi, A., M. Yamada, H. Shida, D. Nakazawa, Y. Kusunoki, A. Nakamura, H. Miyoshi, U. Tomaru, T. Atsumi, and A. Ishizu. 2016. Circulating Neutrophil Extracellular Trap Levels in Well-Controlled Type 2 Diabetes and Pathway Involved in Their Formation Induced by High-Dose Glucose. *Pathobiology* 83:243-251.
- Mosser, D.M., and J.P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8:958-969.
- Muller, W.A. 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82:521-533.
- Murakami, M. 2011. Lipid mediators in life science. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 60:7-20.
- Murphy, P.M. 1994. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annual review of immunology* 12:593-633.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
- Nathan, C. 2008. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nature immunology* 9:695-698.
- Newson, J., M. Stables, E. Karra, F. Arce-Vargas, S. Quezada, M. Motwani, M. Mack, S. Yona, T. Audzevich, and D.W. Gilroy. 2014. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood* 124:1748-1764.
- Nolan, E., Y.M. O'Meara, and C. Godson. 2013. Lipid mediators of inflammation in obesity-related glomerulopathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 28 Suppl 4:iv22-29.
- Obinata, H., and T. Hla. 2012. Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 34:73-91.
- Ohd, J.F., K. Wikstrom, and A. Sjolander. 2000. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 119:1007-1018.
- Okamoto, H., N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu, and Y. Takuwa. 2000. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Molecular and cellular biology* 20:9247-9261.
- Okamura, N., H. Nakadate, K. Ishida, S. Nakahara, Y. Isobe, M. Ohbu, and I. Okayasu. 2005. Telangiectatic focal nodular hyperplasia of the liver in the perinatal period: case report. *Pediatr Dev Pathol* 8:581-586.
- Oo, M.L., S. Thangada, M.T. Wu, C.H. Liu, T.L. Macdonald, K.R. Lynch, C.Y. Lin, and T. Hla. 2007. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *The Journal of biological chemistry* 282:9082-9089.
- Ortega-Gomez, A., M. Perretti, and O. Soehnlein. 2013. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine* 5:661-674.
- Oskeritzian, C.A., N.C. Hait, P. Wedman, A. Chumanevich, E.M. Kolawole, M.M. Price, Y.T. Falanga, K.B. Harikumar, J.J. Ryan, S. Milstien, R. Sabbadini, and S. Spiegel. 2015. The sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 2 axis regulates early airway T-cell infiltration in murine mast cell-dependent acute allergic responses. *The Journal of allergy and clinical immunology* 135:1008-1018 e1001.
- Pappu, R., S.R. Schwab, I. Cornelissen, J.P. Pereira, J.B. Regard, Y. Xu, E. Camerer, Y.W. Zheng, Y. Huang, J.G. Cyster, and S.R. Coughlin. 2007. Promotion of lymphocyte egress into

- blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316:295-298.
- Park, J.H., H.Y. Min, S.S. Kim, J.Y. Lee, S.K. Lee, and Y.S. Lee. 2004. Styrylquinazolines: a new class of inhibitors on prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-activated macrophage cells. *Arch Pharm (Weinheim)* 337:20-24.
- Parrill, A.L., S. Lima, and S. Spiegel. 2012. Structure of the first sphingosine 1-phosphate receptor. *Science signaling* 5:pe23.
- Pchejetski, D., M. Golzio, E. Bonhoure, C. Calvet, N. Doumerc, V. Garcia, C. Mazerolles, P. Rischmann, J. Teissie, B. Malavaud, and O. Cuvillier. 2005. Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer research* 65:11667-11675.
- Perez, D.A., J.P. Vago, R.M. Athayde, A.C. Reis, M.M. Teixeira, L.P. Sousa, and V. Pinho. 2014. Switching off key signaling survival molecules to switch on the resolution of inflammation. *Mediators of inflammation* 2014:829851.
- Pham, T.H., P. Baluk, Y. Xu, I. Grigorova, A.J. Bankovich, R. Pappu, S.R. Coughlin, D.M. McDonald, S.R. Schwab, and J.G. Cyster. 2010. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *The Journal of experimental medicine* 207:17-27.
- Pinho, V., R.C. Russo, F.A. Amaral, L.P. de Sousa, M.M. Barsante, D.G. de Souza, J.C. Alves-Filho, D.C. Cara, J.S. Hayflick, C. Rommel, T. Ruckle, A.G. Rossi, and M.M. Teixeira. 2007. Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *Journal of immunology* 179:7891-7898.
- Pinho, V., D.G. Souza, M.M. Barsante, F.P. Hamer, M.S. De Freitas, A.G. Rossi, and M.M. Teixeira. 2005. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *Journal of leukocyte biology* 77:800-810.
- Pitson, S.M., P.A. Moretti, J.R. Zebol, H.E. Lynn, P. Xia, M.A. Vadas, and B.W. Wattenberg. 2003. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *The EMBO journal* 22:5491-5500.
- Poon, I.K., C.D. Lucas, A.G. Rossi, and K.S. Ravichandran. 2014. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature reviews. Immunology* 14:166-180.
- Porter, A.G., and R.U. Janicke. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:99-104.
- Prince, L.R., M.K. Whyte, I. Sabroe, and L.C. Parker. 2011. The role of TLRs in neutrophil activation. *Current opinion in pharmacology* 11:397-403.
- Randolph, G.J. 2014. A macrophage revolution-and beyond. *Immunol Rev* 262:5-8.
- Ravichandran, K.S. 2010. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 207:1807-1817.
- Ravichandran, K.S., and U. Lorenz. 2007. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature reviews. Immunology* 7:964-974.
- Reis, A.C., A.L. Alessandri, R.M. Athayde, D.A. Perez, J.P. Vago, T.V. Avila, T.P. Ferreira, A.C. de Arantes, S. Coutinho Dde, M.A. Rachid, L.P. Sousa, M.A. Martins, G.B. Menezes, A.G. Rossi, M.M. Teixeira, and V. Pinho. 2015. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell death & disease* 6:e1632.
- Rivera, J., R.L. Proia, and A. Olivera. 2008. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nature reviews. Immunology* 8:753-763.
- Roviezzo, F., V. Brancaleone, L. De Gruttola, V. Vellecco, M. Bucci, B. D'Agostino, D. Cooper, R. Sorrentino, M. Perretti, and G. Cirino. 2011. Sphingosine-1-phosphate modulates

- vascular permeability and cell recruitment in acute inflammation in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 337:830-837.
- Ryan, J.J., and S. Spiegel. 2008. The role of sphingosine-1-phosphate and its receptors in asthma. *Drug News Perspect* 21:89-96.
- Santulli-Marotto, S., A. Gervais, J. Fisher, B. Strake, C.A. Ogden, C. Riveley, and J. Giles-Komar. 2015. Discovering Molecules That Regulate Efferocytosis Using Primary Human Macrophages and High Content Imaging. *PloS one* 10:e0145078.
- Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature reviews. Immunology* 2:965-975.
- Savill, J., and V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784-788.
- Sawatzky, D.A., D.A. Willoughby, P.R. Colville-Nash, and A.G. Rossi. 2006. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am J Pathol* 168:33-41.
- Schif-Zuck, S., N. Gross, S. Assi, R. Rostoker, C.N. Serhan, and A. Ariel. 2011. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *European journal of immunology* 41:366-379.
- Schuh, K., and A. Pahl. 2009. Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury. *Biochem Pharmacol* 77:1827-1834.
- Schulte, D., V. Kupperts, N. Dartsch, A. Broermann, H. Li, A. Zarbock, O. Kamenyeva, F. Kiefer, A. Khandoga, S. Massberg, and D. Vestweber. 2011. Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *The EMBO journal* 30:4157-4170.
- Schwab, J.M., N. Chiang, M. Arita, and C.N. Serhan. 2007. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447:869-874.
- Schwab, S.R., and J.G. Cyster. 2007. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature immunology* 8:1295-1301.
- Segawa, K., S. Kurata, Y. Yanagihashi, T.R. Brummelkamp, F. Matsuda, and S. Nagata. 2014. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* 344:1164-1168.
- Serhan, C.N. 2008. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:157-163.
- Serhan, C.N., S.D. Brain, C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C. Haslett, L.A. O'Neill, M. Perretti, A.G. Rossi, and J.L. Wallace. 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:325-332.
- Serhan, C.N., and J. Savill. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* 6:1191-1197.
- Shimizu, T. 2009. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 49:123-150.
- Shiow, L.R., D.B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L.L. Lanier, J.G. Cyster, and M. Matloubian. 2006. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440:540-544.
- Simon, S.I., and C.E. Green. 2005. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annual review of biomedical engineering* 7:151-185.
- Snider, A.J., T. Kawamori, S.G. Bradshaw, K.A. Orr, G.S. Gilkeson, Y.A. Hannun, and L.M. Obeid. 2009. A role for sphingosine kinase 1 in dextran sulfate sodium-induced

- colitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:143-152.
- Soehnlein, O., and L. Lindbom. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 10:427-439.
- Sousa, L.P., A.L. Alessandri, V. Pinho, and M.M. Teixeira. 2013. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Current opinion in pharmacology* 13:625-631.
- Sousa, L.P., A.F. Carmo, B.M. Rezende, F. Lopes, D.M. Silva, A.L. Alessandri, C.A. Bonjardim, A.G. Rossi, M.M. Teixeira, and V. Pinho. 2009. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 78:396-405.
- Sousa, L.P., F. Lopes, D.M. Silva, L.P. Tavares, A.T. Vieira, B.M. Rezende, A.F. Carmo, R.C. Russo, C.C. Garcia, C.A. Bonjardim, A.L. Alessandri, A.G. Rossi, V. Pinho, and M.M. Teixeira. 2010. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *Journal of leukocyte biology* 87:895-904.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2007. Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *The Journal of biological chemistry* 282:2125-2129.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2011. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature reviews. Immunology* 11:403-415.
- Stables, M.J., and D.W. Gilroy. 2011. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 50:35-51.
- Steinke, J.W., and L. Borish. 2006. 3. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117:S441-445.
- Strub, G.M., M. Maceyka, N.C. Hait, S. Milstien, and S. Spiegel. 2010. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Advances in experimental medicine and biology* 688:141-155.
- Sugimoto, M.A., L.P. Sousa, V. Pinho, M. Perretti, and M.M. Teixeira. 2016. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in immunology* 7:160.
- Summers, C., S.M. Rankin, A.M. Condliffe, N. Singh, A.M. Peters, and E.R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* 31:318-324.
- Taha, T.A., Y.A. Hannun, and L.M. Obeid. 2006. Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *Journal of biochemistry and molecular biology* 39:113-131.
- Tak, T., K. Tesselaar, J. Pillay, J.A. Borghans, and L. Koenderman. 2013. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of leukocyte biology* 94:595-601.
- Terai, K., T. Soga, M. Takahashi, M. Kamohara, K. Ohno, S. Yatsugi, M. Okada, and T. Yamaguchi. 2003. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience* 116:1053-1062.
- Vago, J.P., C.R. Nogueira, L.P. Tavares, F.M. Soriani, F. Lopes, R.C. Russo, V. Pinho, M.M. Teixeira, and L.P. Sousa. 2012. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of leukocyte biology* 92:249-258.
- Vago, J.P., L.P. Tavares, C.C. Garcia, K.M. Lima, L.O. Perucci, E.L. Vieira, C.R. Nogueira, F.M. Soriani, J.O. Martins, P.M. Silva, K.B. Gomes, V. Pinho, S. Bruscoli, C. Riccardi, E. Beaulieu, E.F. Morand, M.M. Teixeira, and L.P. Sousa. 2015. The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. *Journal of immunology* 194:4940-4950.
- Van-Assche, T., V. Huygelen, M.J. Crabtree, and C. Antoniades. 2011. Gene therapy targeting inflammation in atherosclerosis. *Current pharmaceutical design* 17:4210-4223.

- Viryasova, G.M., E.A. Golenkina, S.I. Galkina, T.V. Gaponova, Y.M. Romanova, and G.F. Sud'ina. 2016. Effects of phosphodiester and phosphorothioate ODN2216 on leukotriene synthesis in human neutrophils and neutrophil apoptosis. *Biochimie* 125:140-149.
- Walzer, T., L. Chiossone, J. Chaix, A. Calver, C. Carozzo, L. Garrigue-Antar, Y. Jacques, M. Baratin, E. Tomasello, and E. Vivier. 2007. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature immunology* 8:1337-1344.
- Weninger, W., M. Biro, and R. Jain. 2014. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nature reviews. Immunology* 14:232-246.
- White, C., H. Alshaker, C. Cooper, M. Winkler, and D. Pchejetski. 2016. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget*
- Winter, S., M. Hultqvist, F. Laulund, and R. Holmdahl. 2016. A reduction in intracellular reactive oxygen species due to a mutation in NCF4 promotes autoimmune arthritis in mice. *Antioxid Redox Signal*
- Wynn, T.A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 214:199-210.
- Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496:445-455.
- Xiong, Y., H.J. Lee, B. Mariko, Y.C. Lu, A.J. Dannenberg, A.S. Haka, F.R. Maxfield, E. Camerer, R.L. Proia, and T. Hla. 2013. Sphingosine kinases are not required for inflammatory responses in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 288:32563-32573.
- Yabu, T., H. Shiba, Y. Shibasaki, T. Nakanishi, S. Imamura, K. Touhata, and M. Yamashita. 2015. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nSMase1 by JNK signaling. *Cell death and differentiation* 22:258-273.
- Yamaguchi, Y., Y. Hayashi, Y. Sugama, Y. Miura, T. Kasahara, S. Kitamura, M. Torisu, S. Mita, A. Tominaga, and K. Takatsu. 1988. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *The Journal of experimental medicine* 167:1737-1742.
- Yuan, S.Y., Q. Shen, R.R. Rigor, and M.H. Wu. 2012. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvascular research* 83:82-88.
- Zemann, B., N. Urtz, R. Reuschel, D. Mechtcheriakova, F. Bornancin, R. Badegruber, T. Baumruker, and A. Billich. 2007. Normal neutrophil functions in sphingosine kinase type 1 and 2 knockout mice. *Immunol Lett* 109:56-63.
- Zhang, L., M. Orban, M. Lorenz, V. Barocke, D. Braun, N. Urtz, C. Schulz, M.L. von Bruhl, A. Tirniceriu, F. Gaertner, R.L. Proia, T. Graf, S.S. Bolz, E. Montanez, M. Prinz, A. Muller, L. von Baumgarten, A. Billich, M. Sixt, R. Fassler, U.H. von Andrian, T. Junt, and S. Massberg. 2012. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 209:2165-2181.
- Zhang, L., H. Wang, K. Ding, and J. Xu. 2015. FTY720 induces autophagy-related apoptosis and necroptosis in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett* 236:43-59.
- Zlotnik, A., O. Yoshie, and H. Nomiyama. 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7:243.

10. – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO.

ANEXO 1 – Artigo publicado na revista *Mediators of Inflammation*.

Hindawi Publishing Corporation
Mediators of Inflammation
Volume 2014, Article ID 829851, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/829851>



Review Article

Switching Off Key Signaling Survival Molecules to Switch On the Resolution of Inflammation

Denise Alves Perez,^{1,2} Juliana Priscila Vago,^{2,3} Rayssa Maciel Athayde,^{1,2}
Alesandra Corte Reis,^{1,2} Mauro Martins Teixeira,² Lirlândia Pires Sousa,^{2,3}
and Vanessa Pinho^{1,2}

¹ Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

² Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Laboratório de Sinalização Inflamação, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Vanessa Pinho; vpinho@icb.ufmg.br

Received 14 April 2014; Revised 2 June 2014; Accepted 1 July 2014; Published 17 July 2014

Academic Editor: Victor M. Baizabal-Aguirre

Copyright © 2014 Denise Alves Perez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Inflammation is a physiological response of the immune system to injury or infection but may become chronic. In general, inflammation is self-limiting and resolves by activating a termination program named resolution of inflammation. It has been argued that unresolved inflammation may be the basis of a variety of chronic inflammatory diseases. Resolution of inflammation is an active process that is fine-tuned by the production of proresolving mediators and the shutdown of intracellular signaling molecules associated with cytokine production and leukocyte survival. Apoptosis of leukocytes (especially granulocytes) is a key element in the resolution of inflammation and several signaling molecules are thought to be involved in this process. Here, we explore key signaling molecules and some mediators that are crucial regulators of leukocyte survival *in vivo* and that may be targeted for therapeutic purposes in the context of chronic inflammatory diseases.

1. Introduction

Inflammation is a reaction of an organism to cell and tissue damage caused by various types of agents (sterile or not, including autoimmune events). Inflammation may also be physiological and is thought to be crucial for the maintenance of tissue homeostasis [1–5]. Important micro-circulatory events occur during the inflammatory process, including vascular permeability, changes in the movement, recruitment and accumulation of leukocytes, and the release of inflammatory mediators [6]. After elimination of the harmful agent, the inflammatory process is usually resolved, as seen by the reduction in the number of leukocytes in the inflammatory site and the reversal of vascular changes. Resolution is necessary to restore the original architecture

and function of a given tissue. Failure to resolve can cause persistent inflammation with consequent maintenance or increase of tissue destruction [3]. It has been argued that unresolved inflammation or excessive initial inflammation may be the basis of a variety of chronic inflammatory diseases [7].

The resolution of inflammation is an active process that is coordinated and controlled by a variety of extracellular and intracellular molecules [4]. With the termination of the inflammatory stimulus, the reduction of proinflammatory mediators occurs at the site through the decreased synthesis and increased catabolism of these molecules [4, 8]. The release of proresolving mediators also occurs which prevents further migration and increases apoptotic events of leukocytes (primarily granulocytes) [9]. In parallel, some

proresolving molecules are able to induce the incoming of nonphlogistic macrophages to further perpetuate efferocytosis of apoptotic granulocytes. In doing so, proresolving molecules reprogram macrophages to perform more restorative and resolute roles, thus amplifying the production of proresolving molecules and promoting resolution [10, 11]. These events mark the beginning of the resolution process, which is essential to reestablish tissue homeostasis [4, 8, 10, 12].

Some leucocytes, such as granulocytes (mainly neutrophils and eosinophils) and macrophages, are profoundly involved in the inflammatory response. Granulocytes release toxic compounds and also act as phagocytes together with macrophages to remove the agent causing inflammation. However, for the inflammatory process to be successful and self-limiting (with the goal of restoring tissue homeostasis), the actions of neutrophils and eosinophils must be finely regulated [3, 4, 8]. Thus, apoptosis of granulocytes followed by the efferocytosis (phagocytosis of apoptotic cells) by macrophages and an active resolution process are obvious avenues to achieve this goal [6, 10, 12].

Several signaling molecules, including PI3K/Akt, NF- κ B, MAPKs, and CDKs, have been shown to be involved in enhancing granulocyte survival *in vivo* and *in vitro* [13–16]. The rationale behind enhanced granulocyte survival involves delaying death of these cells to enable efficient effector function, such as bacterial killing. However, if not finely controlled, prolonged activation of survival pathways and prevention of apoptosis in granulocytes may eventually delay inflammation resolution. In contrast with the molecules described above, proresolving mediators, including Annexin A1 (AnxA1), hydrogen peroxide (H_2O_2), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) elevating agents (see Figure 1), and other specialized lipid mediators (lipoxin A_4 , resolvins, maresins, and protectins), perform the opposite action; that is, they induce granulocyte apoptosis. Recent studies have shown that strategies that modulate apoptosis-controlling proteins may promote the resolution of the inflammatory process [17–22]. Therefore, potential therapeutic strategies that modulate the resolution pathways may further represent a useful pharmacological arsenal for the treatment and prevention of various acute and chronic inflammatory diseases. Here, we discuss some aspects of the complex signaling network and some interventions that interfere with key signaling molecules associated with leukocyte survival and consequently contribute to inflammation resolution and return to homeostasis.

2. Signaling Molecules as Crucial Regulators of the Resolution of Inflammation

2.1. Cyclin-Dependent Kinases. Cyclin-dependent kinases (CDK) are serine/threonine protein kinases that bind to cyclin to mediate the phosphorylation reactions that are associated with the progression and regulation of the cell cycle [23]. Surprisingly, terminally differentiated cells, including neutrophils, also express CDKs [24]. Previous studies have demonstrated that human neutrophils express CDK

isoforms and their activity is associated with neutrophil lifespan [24–28]. More recent data have shown that CDK inhibitors (CDKi) drive granulocyte apoptosis and resolve inflammation by downregulating Mcl-1 and upregulating proapoptotic proteins such as Bim [24, 26, 27, 29–31]. In several models of inflammation, including passively induced arthritis, bleomycin-induced lung injury, and carrageenan-elicited acute pleurisy, R-roscovitine, a selective inhibitor of cyclin-dependent kinases CDK2, CDK5, CDK7, and CDK9, enhanced the resolution of established inflammation. This resolution was associated with an increase in neutrophil apoptosis in a caspase-dependent manner [24]. In murine models, it has also been reported that the induction of neutrophil apoptosis with R-roscovitine in conjunction with antibiotic therapy reduces markers of neuronal damage of pneumococcal meningitis [30]. Moreover, neutrophil clearance mediated through CDK inhibition reduced the lung inflammation induced by lipoteichoic acid, *Streptococcus pneumoniae*, and bleomycin-induced lung injury models [26, 32]. R-roscovitine inhibits the CDK7- and CDK9-dependent phosphorylation of RNA polymerase II to block the transcriptional capacity of neutrophils, which can be a key mechanism associated with neutrophil apoptosis after CDK inhibition [26]. The studies discussed above clearly demonstrate that CDK inhibitors induce apoptosis and *in vivo* clearance of nonproliferating cells, such as granulocytes. AT7519 is a more recently investigated CDK inhibitor that has been evaluated in clinical trials for anticancer therapy [33]. A study by Alessandri et al. demonstrated that AT7519 induced eosinophil apoptosis and enhanced the resolution of allergic pleurisy [31]. AT7519 was also capable of inducing neutrophil apoptosis and accelerating the resolution of inflammation induced by LPS or *Escherichia coli* without the impairment of bacterial clearance [34]. Importantly, AT7519 has already been tested to treat patients with refractory solid tumors [33]. Altogether, these findings suggest that CDK may be a useful therapeutic strategy for the treatment of inflammatory diseases.

2.2. Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) and Extracellular-Signal-Regulated Kinase (ERK). The mitogen-activated protein kinases (MAPK) represent a family of serine threonine kinases that phosphorylate and activate transcription factors present in the cytoplasm or nucleus to drive the expression of genes and consequently biological responses. There are three main MAPK-activated signaling cascades that lead to differential gene expression: extracellular-signal-regulated kinase ERK1/2, p38 MAP kinase, and c-Jun N-terminal kinases (JNKs); these cascades are activated by several stimuli to regulate proliferation, differentiation, cell survival, mitosis, apoptosis, and other cell functions [35, 36]. The MEK/ERK signaling pathway has been targeted in an attempt to promote resolution of acute inflammation. Thus, it has been demonstrated that treatment with U0126, a potent and selective MEK1/2 inhibitor (a kinase upstream ERK1/2), was able to reduce inflammatory parameters in a murine model of allergic asthma [37] and LPS-induced lung injury [38]. Additionally,

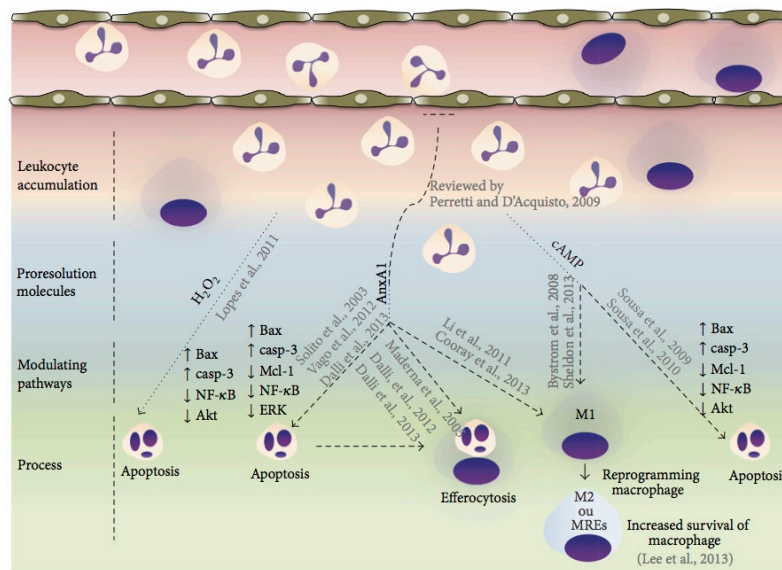


FIGURE 1: Targets to promote granulocyte apoptosis and inflammation resolution. During early phase of inflammation production of proinflammatory mediators and activation of signal survival pathways (PI3K/Akt, NF- κ B, MAPKs, and CDKs) promotes leukocyte accumulation and survival in the inflammatory site. While inflammatory response evolves, local activation/release of proresolution mediators occurs and pathways (H_2O_2 , AnxA1, and cAMP) that control further granulocyte ingress and turn on a resolution program. These resolution molecules, in addition to proresolving lipid mediators which are not highlighted in this cartoon, downregulate survival pathways and activate an apoptosis-associated program in granulocytes. Resolution molecules are also able to promote efferocytosis and coordinate reprogramming of macrophages. These events will reestablish tissue homeostasis.

the use of a specific ERK1/2 inhibitor (PD98059) augmented the resolution of inflammation in a pleurisy model; this was associated with the inhibition of the production of neutrophil survival factors at the site of inflammation and the increased neutrophil apoptosis [39]. A recent study *in vitro* demonstrated that MSK1/2 (mitogen- and stress-activated protein kinase 1 and 2)—two kinases phosphorylated by both ERK1/2 and p38 MAPK—are associated with control on the induction of cyclooxygenase- (COX-) 2 mRNA and the IL-10 production through CREB (cAMP responsive element-binding protein) in macrophages stimulated or not with LPS [40]. However, there is no evidence that MSK1/2 are relevant for resolution of inflammation *in vivo*. Therefore, although the anti-inflammatory effects of MAPK inhibitors have been clearly defined, the potential of these inhibitors to promote inflammation resolution needs to be better clarified using other models of *in vivo* inflammation.

2.3. Cyclic Adenosine Monophosphate. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is a ubiquitous second messenger

produced after adenylate cyclase activation that has been shown to play an important role in modulating the activity of cells involved in the inflammatory process, primarily through PKA activity [41]. Intracellular levels of cAMP are physiologically modulated by agonist ligands (such as PGE_2 , adenosine, and β -adrenergic) and are fine-tuned and controlled by phosphodiesterases (PDEs), which are intracellular enzymes that hydrolyze cAMP [41, 42]. In addition to known anti-inflammatory properties of cAMP-elevating agents [41–44], emerging data support a role for cAMP in some steps of the resolution process [20, 45–47]. Our research group demonstrated an important role for cAMP in inducing the resolution of acute inflammation by modulating the apoptosis of granulocytes *in vivo* [20, 45]. cAMP elevation, which is mimicked by the administration of cAMP mimetic compounds or promoted by rolipram (a PDE4 inhibitor), induced the resolution of both eosinophilic [45] and neutrophilic inflammation [20], which was mediated by PKA and dependent on granulocyte apoptosis. The resolution induced by increasing cAMP levels has been associated with the modulation of several molecular

pathways, which are important for leukocyte survival. For example, it has been shown that high concentrations of cAMP decrease pro-survival intracellular molecules, including MCL-1, PI3K, and NF- κ B and increase levels of proapoptotic molecules: BAX and cleaved caspase-3 [20]. Lower levels of cAMP may account for the lack of resolution of inflammation in a murine model of chronic granulomatous disease [48].

Emerging concepts about the role of cAMP in inflammation resolution came first from Bystrom and cols [46], who demonstrated the participation of cAMP in reprogramming inflammatory macrophages to resolution-phase macrophages. In agreement with these findings, a recent paper showed that cAMP contributes to resolution by polarizing M1 to M2 macrophages [49]. In addition to inducing macrophage reprogramming, enhanced levels of cAMP induced by binding to lysophosphatidylserine (lyso-PS) expressed on apoptotic neutrophils are also involved in efferocytosis [50, 51]. Lyso-PS acts on the macrophage G2A receptor and enhances the clearance of these neutrophils by signaling through the PKA-dependent increase of Rac1 activity via an increased production of PGE₂ and cAMP [52]. However, whether the above-described mechanisms of cAMP may be applied in *in vivo* situations of inflammation remains to be determined.

cAMP may function as an intermediate of the effects of certain pro-resolution molecules. For example, one study suggests that RvD1 is able to increase intracellular levels of cAMP and rescue macrophage apoptosis in a cAMP-dependent manner [47]. A recent study by our group demonstrated that treatment with a PDE4 inhibitor, which enhances cAMP, induced resolution of inflammation that was associated with increased levels of AnxA1 [21]. Altogether these data suggest that cAMP is a crucial control molecule in the resolution of inflammation. Not only is cAMP induced by pro-resolution molecules but it may also induce the release of pro-resolution molecules, thus acting at multiple regulatory levels to induce resolution. Therefore, cAMP-elevating drugs may represent a useful therapeutic strategy to induce the resolution of inflammation.

2.4. Phosphoinositide 3-Kinases. Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) are a family of intracellular lipid kinases that phosphorylate the 3-OH group of inositol membrane lipids, thus regulating many aspects of cell function, including cell metabolism, survival, and polarity. This family can be divided into three main classes (I, II, and III) based on structural and biochemical characteristics [53, 54]. In mammals, isoforms of PI3K are related to signal transduction, and each isoform plays a different role [53]. Class I is subdivided into two subclasses, IA and IB. PI3K γ is the only member of class IB and is the most highly expressed in cells of the immune system. This isoform is composed of the p110 γ catalytic subunit and the p101 regulatory subunit and is activated by the G $\beta\gamma$ subunits of G proteins [55, 56]. PI3Ks are known to be important in many cell processes related to the immune system, including cell activation, migration [55, 57, 58], and cell survival, via the phosphorylation of Akt/protein kinase B

(PKB) [20, 45]; PI3Ks are also activated by antigen, cytokine, and chemokine receptors [59].

Our group has evaluated the role of PI3K γ in inducing and maintaining the inflammatory process in experimental models. In a model of allergic pleurisy in mice, the inhibition of PI3K cleared accumulated eosinophils and increased the number of apoptotic events. Experiments using adoptive transfer of bone marrow cells showed that PI3K γ on leukocytes was required for the maintenance of eosinophil influx at the later stages of eosinophilic inflammation [17]. These studies suggest that PI3K γ on leukocytes is relevant for the maintenance of inflammation and that inhibitors of these enzymes could potentially impart on resolution of inflammation.

However, there are no published studies demonstrating that selective blockade of PI3K γ is really pro-resolution *in vivo*. Blockers of PI3K γ may have anti-inflammatory effects *in vivo*, as we have shown in a model of bleomycin-induced pulmonary inflammation [19]. However, a definite demonstration that these enzymes are relevant *in vivo* is lacking as most published studies have only studied the effects of pan PI3K inhibitors, especially wortmannin and LY294002, in preclinical models of inflammation resolution. There are now many new selective PI3K inhibitors in development [60]. Whether such drugs with greater selectivity and safety profile will resolve inflammation *in vivo* needs to be studied.

2.5. Nuclear Factor Kappa B. Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a transcription factor that regulates immune response to both injury and infection [61, 62]. NF- κ B is a convergence point of several signal transduction pathways by conveying the signals of these molecules to the nucleus and promoting transcriptional activation of genes associated with inflammation and cell survival [62]. The activity of NF- κ B is primarily regulated through interactions with inhibitory I κ B proteins. The phosphorylation of I κ B results in its proteasome degradation and the release of NF- κ B (usually composed of p50/p65 heterodimers) for nuclear translocation and activation of gene transcription [61, 62]. Over 750 inhibitors of the NF- κ B pathway have been identified, including a variety of natural and synthetic molecules. These molecules act by inhibiting NF- κ B nuclear translocation/or transactivation or through I κ B super repression [63–67].

Recently, numerous investigations have supported the role of miRNAs in the regulation of NF- κ B. miRNAs have been found to be involved in NF- κ B signaling by targeting NF- κ B regulators and effectors [68, 69]. Recent studies have shown that NF- κ B inhibitors may attenuate inflammatory parameters in different experimental models of inflammation [70]. For example, NF- κ B inhibitors possess anti-inflammatory effects in models of lipopolysaccharide-induced lung injury [71], traumatic brain injury [72], colitis [73], and pulmonary arterial hypertension [74]. Fewer studies have evaluated the effects of NF- κ B inhibitors in the resolution of inflammation. Our research group showed that inhibition of NF- κ B promotes resolution in established murine models of neutrophilic and eosinophilic inflammation [22, 45]. The resolution of inflammation induced by

NF- κ B inhibitors in the models of arthritis [22] and allergic pleurisy [45] was associated with enhanced apoptosis of inflammatory cells.

NF- κ B activation usually results in the upregulation of antiapoptotic genes that may lead to cell survival [64]. However, NF- κ B may also control genes associated with survival and anti-inflammation [70, 75]. In this sense, a few studies have shown that NF- κ B inhibitors failed to promote the resolution of inflammation [20] and actually prolonged the inflammatory response by preventing leukocyte apoptosis [70, 76]. Greten and cols also described that NF- κ B could also function as a negative posttranslational regulator of inflammasome activation. Therefore, it is clear that NF- κ B may have dual role, both pro- and antiresolution, in models of inflammation. This duality of function of NF- κ B is likely the result of the central role of this molecule in the convergence of several inflammatory signals [70]. Whether manipulating NF- κ B in inflammation will ultimately result in beneficial functions clearly deserves further investigation.

The discussion above suggests that several signaling pathways have been implicated in leukocyte survival during inflammatory response. It is important to note that each specific molecule associated with a signaling pathway cascade may not work in a disconnected manner. Crosstalk between signaling pathways is likely to be essential for leukocyte survival and much more work is needed to understand the interaction between potential resolution inducing pathways, especially in the context of the complex *in vivo* situation of an inflammatory response. However, as demonstrated above, there are molecules which are crucial for resolution of inflammation and whose effects may be indeed exploited therapeutically [77, 78].

3. Molecules Involved in Apoptosis of Granulocytes and Resolution of the Inflammatory Response

3.1. Annexin A1. Annexin A1 (AnxA1) is a 37 kDa glucocorticoid-induced protein firstly identified by its action on phospholipase- (PL-) A2 inhibition and prevention of eicosanoid synthesis [79]. AnxA1 is a protein member of the annexin superfamily, which exerts its anti-inflammatory activity by binding to receptor ALX (named FPR2, formyl peptide receptor-2, murine), which is also shared with lipoxins [80]. During the initial steps of acute inflammation, AnxA1 limits the recruitment of leukocytes and the production of proinflammatory mediators [80]. During the resolution phase, AnxA1 acts by inducing the apoptosis of neutrophils and this effect is associated with increased expression of cleaved caspase-3 and BAX and decreased expression of pERK1/2, NF- κ B, and MCL-1 [21, 81–83] and increasing efferocytosis by macrophages [83–85]. Interestingly, activation of FPR2 by AnxA1 and LXA4 skewed M1 macrophages to M2-like cells [86]. In this context of macrophage modulation, it was demonstrated that AnxA1 released from apoptotic cells contributed to the immunomodulatory effect of these cells on inflammation cells by damping inflammatory monocyte

activation [87]. Additionally, AnxA1 may induce indirectly the chemoattraction of monocytes [88]. These effects—migration of monocytes and skewing towards a M2-like phenotype—may be relevant in the context of inflammation but remain to be determined *in vivo*.

The N-terminal region of AnxA1 is the major effector portion responsible for the anti-inflammatory action of the protein [80]. However, once in the extravascular space, the major part of the active AnxA1 (37 kDa) contained in neutrophils is cleaved by proteases, particularly elastase and proteinase-3, yielding the inactive AnxA1 (of 33 kDa form) [89, 90]. As a strategy to deliver anxA1 *in vivo*, we and others have explored the therapeutic potential of an AnxA1 peptidomimetic Ac2-26, which retains the biological activity of the entire protein. In a model of acute inflammation triggered by LPS, the administration of Ac2-26 at the peak of inflammation resolved inflammation by inducing caspase-dependent apoptosis of inflammatory cells [21]; this mechanism was also demonstrated using a longer peptide, AnxA1_{2–50} [83]. An AnxA1 cleavage-resistant protein and an AnxA1_{2–50} peptide with a mutation on the cleavage site were demonstrated to be more effective in improving several parameters of inflammation compared with a full length protein and a peptide that was not mutated at the sites of proteases action [83, 90].

One intriguing characteristic of the FPR receptor is that it recognizes both proinflammatory and proresolving signals, thus integrating contrasting cues to determine the course of inflammation [91, 92]. Cooray and cols revealed this intriguing receptor characteristic and showed that the anti-inflammatory signal triggered by AnxA1 (Ac2-26 peptide) and LXA4 promotes FPR2 homodimerization and resolution activities by inducing p38-induced IL-10 production; this stands in contrast with proinflammatory signals, such as SAA, that bind to the receptor alone. Interestingly, Ac2-26 peptide, which is a nonselective FPR ligand (binding to both FPR2 and FPR1), is able to promote the dimerization of FPR1 and FPR2 and change the proinflammatory nature of FPR1 by transducing JNK/caspase-3 proapoptotic signal and promoting resolution of inflammation [93]. These latter findings would help explain the restorative role of Ac2-26 peptide by acting through FPR1 and orchestrating epithelial repair in a model of mucosal inflammation [94]. Thus, AnxA1, its peptidomimetics, or AnxA1-inducer drugs may have great therapeutic potential as resolution inducing drugs *in vivo*.

3.2. Hydrogen Peroxide. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) expressed in phagocytes is a multisubunit enzyme complex that generates hydrogen peroxide (H₂O₂) and other reactive oxygen species (ROS) [95]. Accumulating data has suggested that ROS are not merely injurious but can also downregulate inflammation and contribute to the maintenance of tissue homeostasis [96, 97]. Consistent with this observation, various lines of evidence have indicated a critical role of H₂O₂ for the natural resolution of inflammation and regeneration/repair of tissue

by inducing apoptosis in different cell types such as neutrophil [22], hepatocyte [98], myocytes [97], and endothelial [99] and lymphoma cells [100].

Our group has investigated the effects of H_2O_2 in the context of the resolution of inflammation. Lopes et al. demonstrated that H_2O_2 resolves neutrophilic inflammation by activating BAX and caspase-3 and the shutting down NF- κ B and PI3K pathways. Consistently with the latter observation, deficiency of the gp91^{phox} component of NADPH oxidase was associated with increased inflammation in a model of antigen-induced arthritis. *In vitro*, H_2O_2 has been shown to induce programmed cell death in various cell types, including leukocytes. In these cells, H_2O_2 appears to decrease survival signaling pathways, including PI3K/Akt, the transcription factor NF- κ B, and mitochondrial pathways [22, 101–104]. The situation *in vivo* is much less well known and studies will be needed to determine the precise molecular pathways that control H_2O_2 production and the extracellular and intracellular signaling mechanisms through which H_2O_2 promotes resolution of inflammation. In this sense, a recent study showing that H_2O_2 may induce the expression of AnxA1 raises the hypothesis that AnxA1 could be involved in the proresolving abilities of this molecule [105]. Therefore, although the proresolving role of H_2O_2 is of great interest, further studies on its source and mechanisms of action are clearly needed.

3.3. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand. The TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a cytokine that belongs to the TNF superfamily that was discovered in 1995 [106–108]. TRAIL is able to interact with two proapoptotic death receptors, TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5, as well as three decoy receptors without functional death domains [109, 110]. The role of TRAIL in biological systems is complex. Several studies have demonstrated a key role of TRAIL in controlling a number of different types of cancer [109–115]. However, some studies have shown that TRAIL has important functions in the immune system, including an immunoregulatory function [116–120]. TRAIL is also involved in the control of some autoimmune diseases [121, 122]. For example, the neutralization of endogenous TRAIL may prevent the resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis [123].

A few studies have demonstrated that TRAIL is able to promote apoptosis of human and murine neutrophils [108, 124] and may, hence, promote inflammation resolution. In this regard, it has been shown that the duration of neutrophilic inflammation is enhanced in TRAIL-deficient mice [108]. In addition, TRAIL-deficient mice showed an aberrant inflammatory response associated with reduced apoptosis of inflammatory cells and increased collagen deposition in a model of chronic pulmonary inflammation induced by bleomycin [125]. TRAIL was also found to modulate allergic inflammation. The treatment with antiTRAIL antibody blocked apoptosis of T helper type 2 (Th2) cells and eosinophils and enhanced the inflammatory response [126]. Although conclusive evidence is lacking for a role of TRAIL in the resolution of inflammation [127], the effects of TRAIL

are associated with the apoptosis of leukocytes, suggesting TRAIL's potential therapeutic use for the treatment of established inflammatory diseases. Agonistic antibodies have been produced to treat many cancers; the monoclonal antiTRAIL-R1 antibody (mapatumumab) [128] is currently in clinical development, and five antiTRAIL-R2 antibodies are also being tested (lexatumumab, Apomab, TRA-8, AMG 655, and LB135) [129–133]. Thus, these antibodies could potentially be explored in the context of inflammation resolution.

4. Concluding Remarks

Given the importance of inflammation and its resolution, many studies have sought to better understand the molecular scenario involved in these processes. Some of the actors involved in the resolution of inflammation were mentioned in the present review and were demonstrated to be potential targets of therapeutic approaches. The resolution of inflammation is a vital process that enables the return to homeostasis of the immune system and the organ affected by inflammation, avoiding the development of chronic and autoimmune diseases [8, 134]. *In vitro* studies provide essential information about molecular machinery that helps to elucidate how different intracellular molecules control leukocyte survival in inflammatory sites. However, they do not cover the entire complexity of *in vivo* settings, which include intracellular pathways and molecules that are interrelated or codependent [78]. Moreover, resolution of inflammation, an *in vivo* phenomenon, is much more complex than simple apoptosis of leukocytes and includes switching off proinflammatory pathways, efferocytosis, and the function of cells other than leukocytes. For example, some proresolving mediators act in macrophages by rescuing from apoptosis and by activating them to induce phagocytosis of apoptotic leukocytes (efferocytosis) [53]. There is also evidence to suggest that nonhematopoietic cells may be involved in the context of the resolution of inflammation [135]. However, studies evaluating the role of epithelial cells and other nonprofessional phagocytic cells in the resolution of inflammation are lacking.

Future studies should try to integrate current findings with single signaling molecules with more complex signaling pathways and how they interact with each other, all of these in the complex *in vivo* situation. Consideration should be given not only to pathways associated with apoptosis of leukocytes but also to molecules and pathways associated with triggering efferocytosis. One must also keep in mind that cells other than leukocytes may respond to resolution inducing molecules *in vivo* by releasing secondary mediators which themselves could be more relevant as final mediators of resolution. New animal models in which natural resolution of inflammation does not occur are clearly needed, especially in models accompanied by a degree of chronic fibrosis. Most reported studies have been performed in systems in which resolution eventually occurs. Whether strategies which speed the resolution of inflammation will also resolve inflammation and prevent or reverse fibrosis in a nonresolving chronic model needs to be determined. Finally, one will also need

to take the difficult task of translating experimental findings into human diseases. Whether proresolving strategies will be accompanied by significant degree of immunosuppression is currently not known and will need to be addressed in the future.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Lirlândia Pires Sousa and Vanessa Pinho contributed equally to the coordination of this work.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES, Brazil), Fundação do Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), The Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT in Dengue), and the European Community's Seventh Framework Programme (FP7-2007-2013, Timer consortium) under Grant agreement HEALTH-F4-2011-281608.

References

- [1] R. Medzhitov, "Inflammation 2010: new adventures of an old flame," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 771–776, 2010.
- [2] A. A. Katzenstein and J. L. Myers, "Idiopathic pulmonary fibrosis: Clinical relevance of pathologic classification," *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 157, no. 4, pp. 1301–1315, 1998.
- [3] D. W. Gilroy, T. Lawrence, M. Perretti, and A. G. Rossi, "Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no. 5, pp. 401–416, 2004.
- [4] C. N. Serhan and J. Savill, "Resolution of inflammation: the beginning programs the end," *Nature Immunology*, vol. 6, no. 12, pp. 1191–1197, 2005.
- [5] Y. Isobe, T. Kato, and M. Arita, "Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, Article ID Article 270, 2012.
- [6] O. Chertov, D. Yang, O. M. Zack Howard, and J. J. Oppenheim, "Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses," *Immunological Reviews*, vol. 177, pp. 68–78, 2000.
- [7] C. Nathan and A. Ding, "Nonresolving Inflammation," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 871–882, 2010.
- [8] C. N. Serhan, S. D. Brain, C. D. Buckley et al., "Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms," *The FASEB Journal*, vol. 21, no. 2, pp. 325–332, 2007.
- [9] C. D. Buckley, D. W. Gilroy, and C. N. Serhan, "Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation," *Immunity*, vol. 40, no. 3, pp. 315–327, 2014.
- [10] E. L. Gautier, S. Ivanov, P. Lesnik et al., "Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice," *Blood*, vol. 122, no. 15, pp. 2714–2722, 2013.
- [11] A. Sica and A. Mantovani, "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 3, pp. 787–795, 2012.
- [12] A. Ariel and C. N. Serhan, "New lives given by cell death: Macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, Article ID Article 4, p. 4, 2012.
- [13] S. M. Abraham and A. R. Clark, "Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses," *Biochemical Society Transactions*, vol. 34, part 6, pp. 1018–1023, 2006.
- [14] C. C. Franklin and A. S. Kraft, "Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 27, pp. 16917–16923, 1997.
- [15] P. Chen, J. Li, J. Barnes, G. C. Kokkonen, J. C. Lee, and Y. Liu, "Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 11, pp. 6408–6416, 2002.
- [16] K. V. Salojin, I. B. Owusu, K. A. Millerchip, M. Potter, K. A. Platt, and T. Oravec, "Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 3, pp. 1899–1907, 2006.
- [17] V. Pinho, D. G. Souza, M. M. Barsante et al., "Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 77, no. 5, pp. 800–810, 2005.
- [18] V. Pinho, R. D. C. Russo, F. A. Amaral et al., "Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 11, pp. 7891–7898, 2007.
- [19] R. C. Russo, C. C. Garcia, L. S. Barcelos et al., "Phosphoinositide 3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 89, no. 2, pp. 269–282, 2011.
- [20] L. P. Sousa, F. Lopes, D. M. Silva et al., "PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF- κ B-independent manner," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 87, no. 5, pp. 895–904, 2010.
- [21] L. P. Sousa, J. P. Vago, C. R. C. Nogueira et al., "Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 92, no. 2, pp. 249–258, 2012.
- [22] F. Lopes, F. M. Coelho, V. V. Costa et al., "Resolution of neutrophilic inflammation by H2O2 in antigen-induced arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 63, no. 9, pp. 2651–2660, 2011.
- [23] M. Knockaert, P. Greengard, and L. Meijer, "Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 23, no. 9, pp. 417–425, 2002.
- [24] A. G. Rossi, D. A. Sawatzky, A. Walker et al., "Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 9, pp. 1056–1064, 2006.
- [25] A. E. Leitch, C. Haslett, and A. G. Rossi, "Cyclin-dependent kinase inhibitor drugs as potential novel anti-inflammatory and

- pro-resolution agents," *British Journal of Pharmacology*, vol. 158, no. 4, pp. 1004–1016, 2009.
- [26] A. E. Leitch, C. D. Lucas, J. A. Marwick, R. Duffin, C. Haslett, and A. G. Rossi, "Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation," *Cell Death and Differentiation*, vol. 19, no. 12, pp. 1950–1961, 2012.
- [27] A. E. Leitch, N. A. Riley, T. A. Sheldrake et al., "The cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine down-regulates Mcl-1 to override pro-inflammatory signalling and drive neutrophil apoptosis," *European Journal of Immunology*, vol. 40, no. 4, pp. 1127–1138, 2010.
- [28] M. Rossi, S. Duan, Y. Jeong et al., "Regulation of the CRL4(Cdt2) ubiquitin ligase and cell-cycle exit by the SCFFbxo11 ubiquitin ligase," *Molecular Cell*, vol. 49, no. 6, pp. 1159–1166, 2013.
- [29] R. Duffin, A. E. Leitch, T. A. Sheldrake et al., "The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1," *The FEBS Letters*, vol. 583, no. 15, pp. 2540–2546, 2009.
- [30] U. Koedel, T. Frankenberg, S. Kirschnek et al., "Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis," *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 5, Article ID e1000461, 2009.
- [31] A. L. Alessandri, R. Duffin, A. E. Leitch et al., "Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 9, Article ID e25683, 2011.
- [32] A. J. Hoogendijk, J. J. T. H. Roelofs, J. Duitman et al., "R-roscovitine reduces lung inflammation induced by Lipoteichoic acid and *Streptococcus pneumoniae*," *Molecular Medicine*, vol. 18, no. 7, pp. 1086–1095, 2012.
- [33] D. Mahadevan, R. Plummer, M. S. Squires et al., "A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of AT7519, a cyclin-dependent kinase inhibitor in patients with refractory solid tumors," *Annals of Oncology*, vol. 22, no. 9, pp. 2137–2143, 2011.
- [34] C. D. Lucas, D. A. Dorward, M. A. Tait et al., "Downregulation of Mcl-1 has anti-inflammatory pro-resolution effects and enhances bacterial clearance from the lung," *Mucosal Immunology*, vol. 7, pp. 857–868, 2014.
- [35] G. Pearson, F. Robinson, T. B. Gibson et al., "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions," *Endocrine Reviews*, vol. 22, no. 2, pp. 153–183, 2001.
- [36] B. Kaminska, "MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits," *Biochimica et Biophysica Acta—Proteins and Proteomics*, vol. 1754, no. 1–2, pp. 253–262, 2005.
- [37] W. Duan, J. H. P. Chan, C. H. Wong, B. P. Leung, and W. S. F. Wong, "Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model," *Journal of Immunology*, vol. 172, no. 11, pp. 7053–7059, 2004.
- [38] K. Schuh and A. Pahl, "Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury," *Biochemical Pharmacology*, vol. 77, no. 12, pp. 1827–1834, 2009.
- [39] D. A. Sawatzky, D. A. Willoughby, P. R. Colville-Nash, and A. G. Rossi, "The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-x L and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo," *The American Journal of Pathology*, vol. 168, no. 1, pp. 33–41, 2006.
- [40] K. F. MacKenzie, M. W. M. van den Bosch, S. Naqvi et al., "MSK1 and MSK2 inhibit lipopolysaccharide-induced prostaglandin production via an interleukin-10 feedback loop," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 33, no. 7, pp. 1456–1467, 2013.
- [41] S. H. Soderling and J. A. Beavo, "Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 12, no. 2, pp. 174–179, 2000.
- [42] C. Schudt, A. Hatzelmann, R. Beume, and H. Tenor, "Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology," in *Phosphodiesterases as Drug Targets*, vol. 204 of *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 1–46, Springer, Berlin, Germany, 2011.
- [43] M. M. Teixeira, R. W. Gristwood, N. Cooper, and P. G. Hellewell, "Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future?" *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 18, no. 5, pp. 164–170, 1997.
- [44] D. G. Souza, G. D. Cassali, S. Poole, and M. M. Teixeira, "Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury," *British Journal of Pharmacology*, vol. 134, no. 5, pp. 985–994, 2001.
- [45] L. P. Sousa, A. F. Carmo, B. M. Rezende et al., "Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF- κ B," *Biochemical Pharmacology*, vol. 78, no. 4, pp. 396–405, 2009.
- [46] J. Bystrom, I. Evans, J. Newson et al., "Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP," *Blood*, vol. 112, no. 10, pp. 4117–4127, 2008.
- [47] H. N. Lee and Y. J. Surh, "Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis," *Biochemical Pharmacology*, vol. 86, no. 6, pp. 759–769, 2013.
- [48] R. Rajakarar, J. Newson, E. K. Jackson et al., "Nonresolving inflammation in gp91phox^{-/-} mice, a model of human chronic granulomatous disease, has lower adenosine and cyclic adenosine 5'-monophosphate," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 5, pp. 3262–3269, 2009.
- [49] K. E. Sheldon, H. Shandilya, D. Kepka-Lenhart, M. Poljakovic, A. Ghosh, and S. M. Morris Jr., "Shaping the murine macrophage phenotype: IL-4 and cyclic AMP synergistically activate the arginase 1 promoter," *The Journal of Immunology*, vol. 191, no. 5, pp. 2290–2298, 2013.
- [50] S. C. Frasch, R. F. Fernandez-Boyanapalli, K. Z. Berry et al., "Signaling via macrophage G2A enhances efferocytosis of dying neutrophils by augmentation of rac activity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 14, pp. 12108–12122, 2011.
- [51] S. C. Frasch, K. Z. Berry, R. Fernandez-Boyanapalli et al., "NADPH oxidase-dependent generation of lysophosphatidylserine enhances clearance of activated and dying neutrophils via G2A," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 48, pp. 33736–33749, 2008.
- [52] S. C. Frasch and D. L. Bratton, "Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation," *Progress in Lipid Research*, vol. 51, no. 3, pp. 199–207, 2012.
- [53] J. A. Engelman, J. Luo, and L. C. Cantley, "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism," *Nature Reviews Genetics*, vol. 7, no. 8, pp. 606–619, 2006.
- [54] B. Vanhaesebroeck, L. Stephens, and P. Hawkins, "PI3K signalling: the path to discovery and understanding," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 13, no. 3, pp. 195–203, 2012.
- [55] J. A. Deane and D. A. Fruman, "Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation," *Annual Review of Immunology*, vol. 22, pp. 563–598, 2004.

- [56] B. Vanhaesebroeck and M. D. Waterfield, "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases," *Experimental Cell Research*, vol. 253, no. 1, pp. 239–254, 1999.
- [57] T. Sasaki, J. Irie-Sasaki, R. G. Jones et al., "Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration," *Science*, vol. 287, no. 5455, pp. 1040–1046, 2000.
- [58] E. Hirsch, V. L. Katanaev, C. Garlanda et al., "Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation," *Science*, vol. 287, no. 5455, pp. 1049–1053, 2000.
- [59] D. A. Fruman and L. C. Cantley, "Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems," *Seminars in Immunology*, vol. 14, no. 1, pp. 7–18, 2002.
- [60] T. Shao, J. Wang, J. G. Chen et al., "Discovery of 2-methoxy-3-phenylsulfonamino-5-(quinazolin-6-yl) or quinolin-6-yl)benzamides as novel PI3K inhibitors and anticancer agents by bioisostere," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 75, pp. 96–105, 2014.
- [61] M. S. Hayden and S. Ghosh, "NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions," *Genes & Development*, vol. 26, no. 3, pp. 203–234, 2012.
- [62] G. Bonizzi and M. Karin, "The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 6, pp. 280–288, 2004.
- [63] T. D. Gilmore and M. Herscovitch, "Inhibitors of NF- κ B signaling: 785 and counting," *Oncogene*, vol. 25, no. 51, pp. 6887–6899, 2006.
- [64] B. Hoessel and J. A. Schmid, "The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer," *Molecular Cancer*, vol. 12, no. 1, article 86, 2013.
- [65] Q. Liu, H. Wu, S. M. Chim et al., "SC-514, a selective inhibitor of IKK β attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and NF- κ B activation," *Biochemical Pharmacology*, vol. 86, no. 12, pp. 1775–1783, 2013.
- [66] R. Watanabe, R. W. Azuma, J. Suzuki et al., "Inhibition of NF- κ B activation by a novel IKK inhibitor reduces the severity of experimental autoimmune myocarditis via suppression of T-cell activation," *The American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 305, no. 12, pp. H1761–H1771, 2013.
- [67] C. S. Lee, E. B. Jeong, Y. J. Kim et al., "Quercetin-3-O-(2*H*-galloyl)- α -1-rhamnopyranoside inhibits TNF- α -activated NF- κ B-induced inflammatory mediator production by suppressing ERK activation," *International Immunopharmacology*, vol. 16, no. 4, pp. 481–487, 2013.
- [68] X. Ma, L. E. Becker Buscaglia, J. R. Barker, and Y. Li, "MicroRNAs in NF- κ B signaling," *Journal of Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 3, pp. 159–166, 2011.
- [69] M. P. Boldin and D. Baltimore, "MicroRNAs, new effectors and regulators of NF- κ B," *Immunological Reviews*, vol. 246, no. 1, pp. 205–220, 2012.
- [70] T. Lawrence, D. W. Gilroy, P. R. Colville-Nash, and D. A. Willoughby, "Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 12, pp. 1291–1297, 2001.
- [71] C. F. Chian, C. H. Chiang, C. H. Chuang et al., "Inhibitor of nuclear factor-kappaB, SN50, attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model," *Translational Research*, vol. 163, no. 3, pp. 211–220, 2014.
- [72] Y. X. Sun, D. K. Dai, R. Liu et al., "Therapeutic effect of SN50, an inhibitor of nuclear factor- κ B, in treatment of TBI in mice," *Neurological Sciences*, vol. 34, no. 3, pp. 345–355, 2013.
- [73] M. El-Salhy, K. Umezawa, O. H. Gilja, J. G. Hatlebakk, D. Gundersen, and T. Hausken, "Amelioration of severe TNBS induced colitis by novel AP-1 and NF- κ B inhibitors in rats," *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 813804, 8 pages, 2014.
- [74] S. Hosokawa, G. Haraguchi, A. Sasaki et al., "Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF- κ B) in pulmonary arterial hypertension: effects of synthetic selective NF- κ B inhibitor IMD-0354," *Cardiovascular Research*, vol. 99, no. 1, pp. 35–43, 2013.
- [75] T. Lawrence and C. Fong, "The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 42, no. 4, pp. 519–523, 2010.
- [76] F. R. Greten, M. C. Arkan, J. Bollrath et al., "NF- κ B is a negative regulator of IL-1 β secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKK β ," *Cell*, vol. 130, no. 5, pp. 918–931, 2007.
- [77] L. P. Sousa, A. L. Alessandri, V. Pinho et al., "Pharmacological strategies to resolve acute inflammation," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 13, no. 4, pp. 625–631, 2013.
- [78] A. L. Alessandri, L. P. Sousa, C. D. Lucas, A. G. Rossi, V. Pinho, and M. M. Teixeira, "Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 139, no. 2, pp. 189–212, 2013.
- [79] R. J. Flower and G. J. Blackwell, "Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor which prevents prostaglandin generation," *Nature*, vol. 278, no. 5703, pp. 456–459, 1979.
- [80] M. Perretti and F. D'Acquisto, "Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 1, pp. 62–70, 2009.
- [81] L. Parente and E. Solito, "Annexin I: more than an anti-phospholipase protein," *Inflammation Research*, vol. 53, no. 4, pp. 125–132, 2004.
- [82] E. Solito, A. Kamal, F. Russo-Marie, J. C. Buckingham, S. Marullo, and M. Perretti, "A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin I on human neutrophils," *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 11, pp. 1544–1546, 2003.
- [83] J. Dalli, A. P. Consalvo, V. Ray et al., "Proresolving and tissue-protective actions of annexin A1-based cleavage-resistant peptides are mediated by formyl peptide receptor 2/lipoxin A4 receptor," *Journal of Immunology*, vol. 190, no. 12, pp. 6478–6487, 2013.
- [84] P. Maderna, S. Yona, M. Perretti, and C. Godson, "Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac2-26," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 6, pp. 3727–3733, 2005.
- [85] J. Dalli, C. P. Jones, D. M. Cavalcanti, S. H. Farsky, M. Perretti, and S. M. Rankin, "Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow," *The FASEB Journal*, vol. 26, no. 1, pp. 387–396, 2012.
- [86] Y. Li, L. Cai, H. Wang et al., "Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2," *Oncogene*, vol. 30, no. 36, pp. 3887–3899, 2011.
- [87] D. Pupjalis, J. Goetsch, D. J. Kottas, V. Gerke, and U. Rescher, "Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 102–114, 2011.
- [88] K. E. Blume, S. Soeroes, H. Keppeler et al., "Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates

- a monocytic "find-me" signal," *Journal of Immunology*, vol. 188, no. 1, pp. 135–145, 2012.
- [89] S. M. Oliani and M. Perretti, "Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response," *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, vol. 106, no. 2, supplement 1, pp. 69–77, 2001.
- [90] M. Pederzoli-Ribeil, F. Maione, D. Cooper et al., "Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature," *Blood*, vol. 116, no. 20, pp. 4288–4296, 2010.
- [91] J. G. Filep, "Resolution of inflammation: leukocytes and molecular pathways as potential therapeutic targets," *Frontiers in Immunology*, vol. 4, p. 256, 2013.
- [92] J. G. Filep, "Glucocorticoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury: central role for the PGD2-Nrf2 pathway," *Hypertension*, vol. 63, no. 1, pp. 22–23, 2014.
- [93] S. N. Cooray, T. Gobetti, T. Montero-Melendez et al., "Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 45, pp. 18232–18237, 2013.
- [94] G. Leoni, A. Alam, P. Alexander Neumann et al., "Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 1, pp. 443–454, 2013.
- [95] G. J. Gardiner, S. N. Deffit, S. McLetchie et al., "A role for NADPH oxidase in antigen presentation," *Frontiers in Immunology*, vol. 4, article 295, 2013.
- [96] A. van der Vliet and Y. M. Janssen-Heininger, "Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger?" *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 115, no. 3, pp. 427–435, 2014.
- [97] K. Wang, L. Jiang, G. Deng et al., "Heat shock protein 70 interacts with nucleolin and inhibits its cleavage, down-regulation and apoptosis induced by hydrogen peroxide in myocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, 2010.
- [98] S. Kim, H. Jung, D. Hyun, E. Park, Y. Kim, and C. Lim, "Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells," *Biochimie*, vol. 92, no. 8, pp. 927–932, 2010.
- [99] W. Fang, H. Li, and L. Zhou, "Protective effects of prostaglandin e 1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 31, no. 4, pp. 485–492, 2010.
- [100] F. Klamt, S. Zdanov, R. L. Levine et al., "Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin," *Nature Cell Biology*, vol. 11, no. 10, pp. 1241–1246, 2009.
- [101] J. Li, N. P. Gall, D. J. Grieve, M. Chen, and A. M. Shah, "Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure," *Hypertension*, vol. 40, no. 4, pp. 477–484, 2002.
- [102] C. Chen, M. Chow, W. Huang, Y. Lin, and Y. Chang, "Flavonoids inhibit tumor necrosis factor- α -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor- κ B: Structure-activity relationships," *Molecular Pharmacology*, vol. 66, no. 3, pp. 683–693, 2004.
- [103] M. C. Carreras and J. J. Poderoso, "Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses," *The American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 292, no. 5, pp. C1569–C1580, 2007.
- [104] G. Groeger, C. Quiney, and T. G. Cotter, "Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 11, no. 11, pp. 2655–2671, 2009.
- [105] C. J. Yu, C. J. Ko, C. H. Hsieh et al., "Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress," *Journal of Proteomics*, vol. 99, pp. 40–53, 2014.
- [106] S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak et al., "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis," *Immunity*, vol. 3, no. 6, pp. 673–682, 1995.
- [107] R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi, "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 22, pp. 12687–12690, 1996.
- [108] E. E. McGrath, H. M. Marriott, A. Lawrie et al., "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates inflammatory neutrophil apoptosis and enhances resolution of inflammation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 90, no. 5, pp. 855–865, 2011.
- [109] B. Pennarun, J. H. Kleibeuker, T. Oenema, J. H. Stegehuis, E. G. E. de Vries, and S. de Jong, "Inhibition of IGF-1R-dependent PI3K activation sensitizes colon cancer cells specifically to DR5-mediated apoptosis but not to rhTRAIL," *Analytical Cellular Pathology*, vol. 33, no. 5–6, pp. 229–244, 2010.
- [110] B. Pennarun, A. Meijer, E. G. E. de Vries, J. H. Kleibeuker, F. Kruyt, and S. de Jong, "Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1805, no. 2, pp. 123–140, 2010.
- [111] K. Zhou, Y. Yan, and S. Zhao, "Esophageal cancer-selective expression of TRAIL mediated by MREs of miR-143 and miR-122," *Tumor Biology*, vol. 35, no. 6, pp. 5787–5795, 2014.
- [112] Y. Liu, Z. Yang, C. Gong et al., "Quercetin enhances apoptotic effect of TRAIL in ovarian cancer cells through ROS mediated CHOP-death receptor 5 pathway," *Cancer Science*, vol. 105, no. 5, pp. 520–527, 2014.
- [113] W. C. Lin, H. F. Tsai, H. J. Liao et al., "*Helicobacter pylori* sensitizes TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells through regulation of FLIP," *Cell Death and Disease*, vol. 5, Article ID e1109, 2014.
- [114] P. M. Holland, "Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL?" *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 25, no. 2, pp. 185–193, 2014.
- [115] C. Jennewein, S. Karl, B. Baumann, O. Micheau, K.-M. Debatin, and S. Fulda, "Identification of a novel pro-apoptotic role of NF- κ B in the regulation of TRAIL- and CD95-mediated apoptosis of glioblastoma cells," *Oncogene*, vol. 31, no. 11, pp. 1468–1474, 2012.
- [116] A. Collison, P. S. Foster, and J. Mattes, "Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 36, no. 11, pp. 1049–1053, 2009.
- [117] O. Aktas, U. Schulze-Topphoff, and F. Zipp, "The role of TRAIL/TRAIL receptors in central nervous system pathology," *Frontiers in Bioscience*, vol. 12, no. 8, pp. 2912–2921, 2007.
- [118] K. Steinwede, S. Henken, J. Bohling et al., "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, no. 11, pp. 1937–1952, 2012.

- [119] S. J. Zheng, J. Jiang, H. Shen, and Y. H. Chen, "Reduced apoptosis and ameliorated listeriosis in TRAIL-null mice," *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 9, pp. 5652–5658, 2004.
- [120] C. A. Benedict and C. F. Ware, "Trail: not just for tumors anymore?" *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, no. 11, pp. 1903–1906, 2012.
- [121] A. Anel and L. Martinez-Lostao, "Apo2/trail: New insights in the treatment of autoimmune disorders," *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*, vol. 5, no. 3, pp. 184–199, 2011.
- [122] E. Salehi, M. Vodjgani, A. Massoud et al., "Increased expression of TRAIL and its receptors on peripheral T-cells in type 1 diabetic patients," *Iranian Journal of Immunology*, vol. 4, no. 4, pp. 197–205, 2007.
- [123] Y. Fang, G. C. Sharp, H. Yagita, and H. Braley-Mullen, "A critical role for TRAIL in resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis," *Journal of Pathology*, vol. 216, no. 4, pp. 505–513, 2008.
- [124] S. A. Renshaw, J. S. Parmar, V. Singleton et al., "Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL," *The Journal of Immunology*, vol. 170, no. 2, pp. 1027–1033, 2003.
- [125] E. E. McGrath, A. Lawrie, H. M. Marriott et al., "Deficiency of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates lung injury and fibrosis," *Thorax*, vol. 67, no. 9, pp. 796–803, 2012.
- [126] L. Faustino, D. M. Fonseca, E. B. Florsheim et al., "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediates the resolution of allergic airway inflammation induced by chronic allergen inhalation," *Mucosal Immunology*, 2014.
- [127] A. E. Leitch, C. D. Lucas, and A. G. Rossi, "Editorial: neutrophil apoptosis: hot on the TRAIL of inflammatory resolution," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 90, no. 5, pp. 841–843, 2011.
- [128] J. von Pawel, J. H. Harvey, D. R. Spigel et al., "Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonist monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1), in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer," *Clinical Lung Cancer*, vol. 15, no. 3, pp. 188.e2–196.e2, 2013.
- [129] B. Engesaeter, O. Engebraaten, V. A. Flørenes, and G. M. Mælandsmo, "Dacarbazine and the agonistic TRAIL receptor-2 antibody lexatumumab induce synergistic anticancer effects in melanoma," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e45492, 2012.
- [130] H. Jin, R. Yang, J. Ross et al., "Cooperation of the agonistic DR5 antibody apomab with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 23, pp. 7733–7740, 2008.
- [131] H. M. Amm, T. Zhou, A. D. Steg, H. Kuo, Y. Li, and D. J. Buchsbaum, "Mechanisms of drug sensitization to TRA-8, an agonistic death receptor 5 antibody, involve modulation of the intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells," *Molecular Cancer Research*, vol. 9, no. 4, pp. 403–417, 2011.
- [132] C. S. Fuchs, M. Fakih, L. Schwartzberg et al., "TRAIL receptor agonist conatumumab with modified FOLFOX6 plus bevacizumab for first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a randomized phase 1b/2 trial," *Cancer*, vol. 119, no. 24, pp. 4290–4298, 2013.
- [133] A. Natoni, M. MacFarlane, S. Inoue et al., "TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2," *British Journal of Haematology*, vol. 139, no. 4, pp. 568–577, 2007.
- [134] A. Ortega-Gómez, M. Perretti, and O. Soehnlein, "Resolution of inflammation: an integrated view," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 5, no. 5, pp. 661–674, 2013.
- [135] A. Gall, P. Treuting, K. B. Elkon et al., "Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease," *Immunity*, vol. 36, no. 1, pp. 120–131, 2012.

OPEN

Citation: Cell Death and Disease (2015) 6, e●; doi:10.1038/cddis.2014.580
© 2015 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/15
www.nature.com/cddis

Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation

AC Reis^{1,2,8}, AL Alessandri^{3,8}, RM Athayde^{1,2}, DA Perez^{1,2}, JP Vago⁴, TV Ávila⁵, TP T Ferreira⁶, ACS de Arantes⁶, D de Sá Coutinho⁶, MA Rachid⁷, LP Sousa⁴, MA Martins⁶, GB Menezes¹, AG Rossi³, MM Teixeira² and V Pinho^{1,2}

Eosinophils are effector cells that have an important role in the pathogenesis of allergic disease. Defective removal of these cells likely leads to chronic inflammatory diseases such as asthma. Thus, there is great interest in understanding the mechanisms responsible for the elimination of eosinophils from inflammatory sites. Previous studies have demonstrated a role for certain mediators and molecular pathways responsible for the survival and death of leukocytes at sites of inflammation. Reactive oxygen species have been described as proinflammatory mediators but their role in the resolution phase of inflammation is poorly understood. The aim of this study was to investigate the effect of reactive oxygen species in the resolution of allergic inflammatory responses. An eosinophilic cell line (Eo1) was treated with hydrogen peroxide and apoptosis was measured. Allergic inflammation was induced in ovalbumin sensitized and challenged mouse models and reactive oxygen species were administered at the peak of inflammatory cell infiltrate. Inflammatory cell numbers, cytokine and chemokine levels, mucus production, inflammatory cell apoptosis and peribronchiolar matrix deposition was quantified in the lungs. Resistance and elastance were measured at baseline and after aerosolized methacholine. Hydrogen peroxide accelerates resolution of airway inflammation by induction of caspase-dependent apoptosis of eosinophils and decrease remodeling, mucus deposition, inflammatory cytokine production and airway hyperreactivity. Moreover, the inhibition of reactive oxygen species production by apocinin or in gp91^{phox-/-} mice prolonged the inflammatory response. Hydrogen peroxide induces Eo1 apoptosis *in vitro* and enhances the resolution of inflammation and improves lung function *in vivo* by inducing caspase-dependent apoptosis of eosinophils.

Cell Death and Disease (2015) 6, e●; doi:10.1038/cddis.2014.580; published online xx xxx 2015

Eosinophils express numerous receptors and secrete a wide variety of inflammatory mediators that influence many innate and adaptive immune responses. These multifunctional cells are important in the defense against helminth infection and are involved in the pathogenesis of many eosinophilic dominant allergic diseases.¹ High levels of eosinophil granule proteins (such as major basic protein (MBP)) have been found in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma and evidence indicates that high-concentration granule products have contributed to the development of airway hyperreactivity (AHR), a cardinal feature of asthma.² Asthma is an inflammatory disease of the airways with participation of many cell types including leukocytes especially eosinophils and lymphocytes.^{3,4} Activation of these cells (mainly lymphocytes) leads to the release of proinflammatory mediators and cytokines such as leukotriene B₄, interleukin-4 (IL-4),

interleukin-5 (IL-5), interleukin-9 (IL-9), interleukin-13 (IL-13) and colony-stimulating factor granulocyte-macrophage (GM-CSF).^{3,5-7} Investigations using preclinical animal models of asthma and clinical studies in patients with asthma have demonstrated that the presence of eosinophils in the lungs are associated with epithelial damage, goblet cell hyperplasia, smooth muscle hypertrophy and airway hyperresponsiveness resulting in airflow limitation which can be fatal.^{3,8-10} Recently, anti-IL-5 treatment has been shown to ameliorate lung function in patients with eosinophilic asthma.¹¹

Apoptosis of leukocytes is regarded as an important process for the successful resolution of inflammatory responses. Reduced eosinophil apoptosis in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid has been shown to correlate positively with severity of asthma.^{3,12-14} Indeed, defective leukocyte apoptosis and subsequent removal of apoptotic cells by

¹Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Medical Research Council Centre for Inflammation Research, The Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK; ⁴Laboratório de Sinalização na Inflamação, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁵Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁶Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and ⁷Laboratório de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

*Corresponding author: V Pinho, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil. Tel/Fax: +55 31 3409 2996; E-mail: vpinho@icb.ufmg.br

⁸These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; MBP, eosinophil granule proteins; AHR, airway hyperreactivity; ROS, reactive oxygen species; RNS, Reactive nitrogen species; OVA, ovalbumin; EPO, eosinophil peroxidase

Received 01.8.14; revised 07.11.14; accepted 19.11.14; Edited by G Amarante-Mendes



ANEXO 3 – Capítulo de livro publicado pela Editora Blucher s/a.

Livro: Biotecnologia Aplicada a Saúde: Fundamentos e Aplicações.

Capítulo: Segmentações, mecanismo e resolução de doenças inflamatórias.

Autores: Denise Alves Perez; Alesandra Corte Reis; Juliana Prsicila Vago; Rayssa Maciel Athayde; Lirlândia Pires de Sousa; Vanessa Pinho; Mauro Martins Teixeira.
Universidade Federal de Minas Gerais.

ANEXO 4 – Protocolos: CEUA E COEP



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 18 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do papel da via da esfingosina na resolução da inflamação pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS).", que tem como responsável Vanessa Pinho da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 25/04/2013. Este certificado expira-se em 25/04/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 18 / 2013, related to the Project entitled "Evaluation of the role of sphingosine pathway in the resolution of acute pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS)", under the supervision of Vanessa Pinho da Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 25/04/2013. This certificate expires in 25/04/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 25/04/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



Projeto: CAAE – 0319.0.203.000-11

Interessado(a): **Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.**
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 29 de julho de 2014, as alterações, abaixo relacionadas, no projeto de pesquisa intitulado "Estudo da função endotelial e cardiovascular em pacientes portadores de sepse: implicações diagnósticas, definição de risco e terapêutica":

1. Avaliação oftalmológica completa; exame clínico, realizado por oftalmologista, no próprio CTI, ou seja, sem necessidade de transporte do paciente para o setor de oftalmologia;
2. Coleta de sangue total para separação de:
 - 2.1 Células mononucleares do sangue periférico (CMSP): avaliar a apoptose celular e viabilidade dessas células, bem como características da via do inflamossoma e da produção de citocinas in vitro (os resultados serão correlacionados com a gravidade e prognóstico dos pacientes);
 - 2.2 Neutrófilos; este estudo pretende avaliar o perfil de ativação e capacidade de migração de neutrófilos, avaliar vias de sinalização da P13K nos neutrófilos através de marcação de atividade de Akt/PKB e sua fosforilação e, por fim, avaliar o efeito do tratamento de inibidores na via da P13K no recrutamento de neutrófilos provenientes de pacientes com sepse;
 - 2.3 estudo da função dos neutrófilos na sepse através da realização de ensaios de marcadores de membrana celular e de moléculas relacionadas à via de sinalização da P13K;
3. Dosagem de alguns micro RNAs (miRNA 150, miRNA 574-5p, miRNA 133* e miRNA 193b) no plasma, que serão testados em relação à gravidade da sepse e ao prognóstico dos pacientes;
4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para familiar ou responsável;
5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente.

A aprovação é válida por dois anos (de 29 de julho de 2014 a 28 de julho de 2017).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

