

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

EDVALDO SOUZA LARA

**AVALIAÇÃO DA VIA PRÓ-RESOLUTIVA ENVOLVENDO A
PROTEÍNA ANEXINA A1 E SEU RECEPTOR FPR-2 NO CONTEXTO
DA PNEUMONIA BACTERIANA EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2023

EDVALDO SOUZA LARA

**AVALIAÇÃO DA VIA PRÓ-RESOLUTIVA ENVOLVENDO A
PROTEÍNA ANEXINA A1 E SEU RECEPTOR FPR-2 NO CONTEXTO
DA PNEUMONIA BACTERIANA EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas (PPGACT) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Lirlândia Pires de Sousa

Coorientadora: Dr^a. Luciana Pádua Tavares

Belo Horizonte

2023

L318a	Lara, Edvaldo Souza. Avaliação da via pró-resolutiva envolvendo a proteína anexina A1 e seu receptor FPR-2 no contexto da pneumonia bacteriana experimental [recurso eletrônico] / Edvaldo Souza Lara. – 2023. 1 recurso eletrônico (81 f. : il.) : pdf Orientadora: Lirlândia Pires de Sousa. Coorientadora: Luciana Pádua Tavares. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas. Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader. 1. Pneumonia – Teses. 2. Inflamação – Teses. 3. Lipocortinas – Teses. 4. Receptores celulares – Teses. 5. Infecções respiratórias – Teses. I. Sousa, Lirlândia Pires de. II. Tavares, Luciana Pádua. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título. CDD: 616.24
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DA VIA PRÓ-RESOLUTIVA ENVOLVENDO A PROTEÍNA ANEXINA A1 E SEU RECEPTOR FPR-2 NO CONTEXTO DA PNEUMONIA BACTERIANA EXPERIMENTAL"

EDVALDO SOUZA LARA

Dissertação de Mestrado **defendida e aprovada**, no dia três de março de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins

Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Vivian Vasconcelos Costa

UFMG

Luciana Pádua Tavares - coorientadora

Brigham and Womens Hospital-Harvard Med School-EUA

Lirlandia Pires de Sousa - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 03 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Lirlandia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 03/03/2023, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 03/03/2023, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins, Usuário Externo**, em 03/03/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Padua Tavares, Usuário Externo**, em 03/03/2023, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2081633** e o código CRC **3FDC9269**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por abençoar o meu caminho e iluminar os meus dias.

À minha orientadora Lirlândia e coorientadora Luciana por terem aceitado me orientar. Agradeço imensamente pelo incentivo, motivação e dedicação constante. As ideias, discussões e planejamentos me permitiram seguir por um caminho seguro no aprendizado da ciência.

Aos professores Dr. Caio Fagundes, Dr. Flávio Amaral, Dr. Mauro Martins, Dr. Remo Russo, Dra. Vanessa Pinho, Dra. Vivian Vasconcelos, pelos ensinamentos e contribuições científicas.

Aos professores da faculdade de farmácia, em especial aos professores do programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Ana Clara, Camila, Felipe, Laís, Isabella Augusto, Izabella Zaidan e Rodrigo. Obrigado pela colaboração, pela amizade, pelo companheirismo, pela disponibilidade, além de tudo, pela palavra que tranquilizava.

À Ilma e à Rose pelo suporte e apoio técnico nos laboratórios de imunofarmacologia.

Ao Celso, pela ajuda com as análises histológicas e com as lâminas.

À minha família, em especial minha mãe Regina, por me guiar sempre pelos caminhos do aprendizado e me apoiar em todas as minhas decisões. Agradeço imensamente pela paciência e suporte para que eu pudesse concluir o mestrado.

Ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela oportunidade e à Andreia por todo suporte em matrículas e documentos.

À banca examinadora Dra. Patrícia, Dra. Vivian e Dr. Flavio pela atenção, pela disponibilidade e por contribuições valiosas.

Agradeço também o apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto, pelas agências: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram significativamente com ensinamentos que levarei para toda vida pessoal e profissional.

‘Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.’
(Leonardo da Vinci).

RESUMO

A pneumonia representa uma das principais causas de morbiletalidade em todo o mundo. Essa patologia resulta da infecção do trato respiratório inferior por microrganismos, como vírus, fungos e principalmente por bactérias Gram-positivos ou Gram-negativos. A inflamação das vias aéreas e parênquima pulmonar desencadeada durante a infecção é essencial e deve ser orquestrada espacial e temporalmente por células e mediadores do sistema imune, visando eliminar os estímulos infecciosos e restaurar a homeostase tecidual, protegendo o hospedeiro dos danos evocados pela infecção. Por outro lado, um engajamento ineficiente do programa de resolução da inflamação durante a infecção pulmonar leva à exacerbação da resposta inflamatória, causando intenso dano pulmonar e disseminação bacteriana, aumentando a gravidade da pneumonia. Recentemente, demonstramos que a via pró-resolutiva engajada pela proteína Anexina A1 (AnxA1) e seu receptor FPR-2 controla a resposta inflamatória e a disseminação bacteriana na pneumonia experimental induzida por pneumococo (uma bactéria Gram-positivo), e que o tratamento de camundongos usando o peptidomimético AnxA1 (Ac₂₋₂₆), proporciona proteção durante pneumonia pneumocócica. Entretanto, o papel dessa via nas infecções causadas por bactérias Gram-negativos, ainda não foi avaliado. Dessa forma, aqui, avaliamos o papel do eixo AnxA1/FPR-2 na resposta inflamatória causada pela pneumonia induzida pela bactéria Gram-negativo *Escherichia coli*. Para isso, camundongos selvagens (WT) e deficientes para Anexina A1 (AnxA1 KO) ou FPR2/3 (FPR-2/3 KO) foram infectados com *E. coli* (ATCC 25922) e eutanasiados após 24 horas para avaliação dos parâmetros inflamatórios e carga bacteriana pulmonar. Em experimentos separados, animais WT infectados com *E. coli*, foram tratados 8h após a infecção com Ac₂₋₂₆ e eutanasiados 24h após a infecção para avaliação dos mesmos parâmetros. Nossos dados mostram que animais AnxA1 KO infectados com *E. coli*, quando comparados ao grupo WT, apresentaram resposta inflamatória acentuada, caracterizada por maior infiltrado neutrofílico nas vias aéreas e menor número de macrófagos, associados à menores contagens de apoptose/eferocitose e maior carga bacteriana nos pulmões. O maior infiltrado neutrofílico em animais AnxA1 KO foi acompanhado de maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias e dano pulmonar. De maneira similar, os animais FPR-2/3 KO apresentaram perfil de resposta inflamatória mais exacerbada, com maior dano pulmonar e maior letalidade frente à infecção por *E. coli*, quando comparados aos animais WT. De maneira interessante, animais infectados e tratados com Ac₂₋₂₆ apresentaram redução do infiltrado neutrofílico e maior número de macrófagos, associados à maiores contagens de apoptose/eferocitose e menor carga bacteriana nas vias aéreas e pulmões. Ainda, o tratamento

com Ac₂₋₂₆ diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e o dano pulmonar associado à infecção. Em resumo, ativação do eixo pró-resolutivo AnxA1/FPR-2 é um importante mecanismo de resolução da resposta inflamatória e do *clearance* bacteriano durante a pneumonia causada por *E. coli*. A utilização do peptídeo Ac₂₋₂₆ se mostrou benéfica neste contexto infeccioso pré-clínico e tem potencial de constituir uma nova estratégia terapêutica adjuntiva para o tratamento de doenças infecciosas pulmonares.

Palavras-chave: pneumonia; inflamação; mediador pró-resolutivo; anexina A1; FPR-2.

ABSTRACT

Pneumonia represents one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. This pathology results from the infection of the lower respiratory tract by microorganisms such as viruses, fungi and mainly by Gram-positive or Gram-negative bacteria. Inflammation of the airways and lung parenchyma triggered during infection is essential and must be orchestrated spatially and temporally by cells and mediators of immune system, aiming to eliminate infectious stimuli and restore tissue homeostasis, protecting the host from the damage caused by the infection. Conversely, an inefficient engagement of the resolution inflammation program during lung infection leads to exacerbation inflammation, causing intense pulmonary damage and bacterial dissemination, increasing pneumonia severity. We have shown that the pro-resolving pathway engaged by the protein Annexin A1 (AnxA1) and its receptor FPR-2 control the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumonia induced by pneumococcus (a Gram-positive bacteria), and treatment of mice using the AnxA1 peptidomimetic AnxA1 Ac₂₋₂₆, afford protection during pneumococcal pneumonia. However, the role of this pathway in infections caused by Gram-negative bacteria has not yet been assessed. Herein, we have evaluated the role of the AnxA1/FPR-2 axis in the inflammatory response caused by pneumonia induced by the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. For that, wild-type (WT) and Annexin A1-deficient (AnxA1 KO) or FPR2/3 (FPR-2/3 KO) mice were infected with *E. coli* (ATCC 25922) and euthanized after 24 hours for evaluation of inflammatory parameters and lung bacterial load. In separate experiments, WT animals infected with *E. coli* were treated 8h after infection with Ac₂₋₂₆ and euthanized 24h after infection for evaluation of the same parameters. Our results show that AnxA1 KO animals infected with *E. coli*, when compared to the WT group, showed a marked inflammatory response, characterized by a greater neutrophilic infiltrate in the airways and a smaller number of macrophages, associated with lower apoptosis/efferocytosis counts and a higher bacterial load in the lungs. The greater neutrophilic infiltrate in AnxA1 KO animals was accompanied by higher levels of pro-inflammatory cytokines and more intense lung damage. Similarly, FPR-2/3 KO animals showed a more exacerbated inflammatory response profile, with greater lung damage and higher lethality associated with *E. coli* infection, when compared to WT animals. Interestingly, *E. coli*-infected mice treated with Ac₂₋₂₆ show reduced neutrophilic infiltration and increased number of macrophages, associated with higher apoptosis/efferocytosis counts and a decreased bacterial load in the airways and lungs. Furthermore, treatment with Ac₂₋₂₆ decreases pro-inflammatory cytokines and lung damage

associated with infection. In summary, the engagement of the AnxA1/FPR-2 axis is an important mechanism for inflammation resolution and bacterial clearance during pneumonia caused by *E. coli*. The Anxa1 peptidomimetic AC₂₋₂₆ was effective in this pre-clinical infectious model and can constitute a new adjunctive therapeutic strategy for the treatment of infectious lung diseases.

Key-words: pneumonia; inflammation; pro-resolving mediator; annexin A1; FPR-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Anatomia do sistema respiratório.....	26
Figura 2: Reconhecimento de LPS por TLR.....	28
Figura 3: Sinais Cardinais da inflamação.....	29
Figura 4: Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo.....	33
Figura 5: Mobilização da Anexina A1 em células ativadas.....	34
Figura 6: Eventos celulares associados aos efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos de AnxA1 e seus peptidomiméticos derivados da porção N-terminal.....	36
Figura 7: A deficiência gênica em AnxA1 intensifica a resposta inflamatória e prejudica o <i>clearance</i> bacteriano no pulmão.....	46
Figura 8: Mensuração de quimiocinas e citocinas em camundongos Balb/C WT e AnxA1 KO infectados com <i>E. coli</i>	47
Figura 9: A deficiência gênica em AnxA1 aumenta parâmetros associados ao dano pulmonar promovido pela infecção por <i>E. coli</i>	48
Figura 10: Análise do escore histológico do pulmão de camundongos Balb/C WT e AnxA1 KO infectados com <i>E. coli</i>	49
Figura 11: Avaliação da função pulmonar de camundongos Balb/C WT e AnxA1 KO 24h após a infecção por <i>E. coli</i>	50
Figura 12: A deficiência gênica em FPR-2/3 intensifica a resposta inflamatória e prejudica o <i>clearance</i> bacteriano.....	51
Figura 13: Mensuração de quimiocinas e citocinas no BAL de camundongos C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO 24h após a infecção por <i>E. coli</i>	52
Figura 14: A deficiência gênica em FPR-2/3 aumenta parâmetros associados ao dano pulmonar promovido pela infecção por <i>E. coli</i>	53

Figura 15: Análise do escore histológico do pulmão de camundongos C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO infectados com <i>E. coli</i>	54
Figura 16: Letalidade de camundongos C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO infectados com <i>E. coli</i> (5x10 ⁶ UFC).....	55
Figura 17: Efeito do tratamento com Ac ₂₋₂₆ no curso da pneumonia induzida por <i>E. coli</i>	56
Figura 18: Efeito do tratamento com Ac ₂₋₂₆ nos níveis de quimiocinas e citocinas induzidos durante a infecção com <i>E. coli</i>	57
Figura 19: Efeito do tratamento com Ac ₂₋₂₆ no dano pulmonar associado à infecção por <i>E. coli</i>	58
Figura 20: Análise do escore histológico do pulmão de camundongos Balb/C WT infectados com <i>E.coli</i> e tratados com Ac ₂₋₂₆	59

LISTA DE SIGLAS E AVREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
ALI	<i>Acute lung injury</i>
ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Anexina A1
Arg-1	Arginase 1
ATCC25922	<i>America Type Culture Collection</i> – Cepa da bactéria <i>E. coli</i>
BAL	Lavado broncoalveola
BALF	Fluído do lavado broncoalveolar
BGN-NF	Bastonete Gram-negativo não fermentador
BSA	Albumina bovina sérica
CLR	Receptor de lectina tipo C
CXCL- ()	Quimiocina ligante () com motivo CXC
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DMSO	Dimetilsufóxido
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
ERK 1/2	<i>Extracellular-regulated kinase 1/2</i>
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
ESBLEC	<i>E. coli</i> produtora de beta-lactamase de espectro estendido
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinal patogênica
FEV ₅₀	Volume expiratório forçado em 50 milisegundos

fMLP	<i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i>
FPR()	Receptor de formil peptídeo ()
GILZ	<i>Glucocorticoid Induced Leucine Zipper</i>
HAP	Pneumonia adquirida no hospital
HETAB	<i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
IRA	Infecção Respiratória Aguda
IL- ()	Interleucina- ()
IL-1R	Receptor de interleucina 1
INF- ()	Interferon- ()
ITU	Infecção do trato urinário
IVRI	Infecção das vias respiratórias inferiores
IVRS	Infecção das vias respiratórias superiores
KO	<i>Knockout</i> / deficiente
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LXA4	Lipoxina A4
M1	Macrófagos do tipo 1
M2	Macrófagos do tipo 2
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase-1</i>
MDR	Microrganismos multidroga resistentes
MGE	Elementos genéticos móveis
MPO	Mieloperoxidase

MRGN	Gram-negativos multirresistentes
Mres	Macrófagos resolutivos
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
N	Número amostral
NaEDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio
NETs	Armadilha extracelular de neutrófilos
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NI	Não infectado
NLR	Receptores do tipo NOD
NOD ()	Ligante de nucleotídeo e domínio de oligomerização ()
OD	Densidade óptica
OPD	<i>o</i> -Phenylenediamine dihidrochloride
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PLA2	Fosfolipase A2
PBS	Tampão de salina fosfato
PMN	Polimorfonucleares
PR3	Proteinase 3
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RLR	Receptores induzidos por ácido retinóico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RvD1	Resolvina D1

SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SEM	<i>Standard error of the mean</i> – Erro padrão da média
TLR ()	Receptores do tipo Toll ()
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TMB	Tetrametilbenzidina
UFC	Unidade formadora de colônia
WT	<i>Wild Type</i> / selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	21
1.1.1	Tratamento da pneumonia induzida por <i>E. coli</i>	24
1.2	RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS NO PULMÃO	25
1.2.1	Resposta inflamatória durante a pneumonia por Gram-negativo	29
1.2.2	O eixo pró-resolutivo Anexina A1/FPR-2 na resposta inflamatória	33
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVO	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Animais	40
4.2	<i>Escherichia coli</i>	40
4.3	Infecção dos camundongos	40
4.4	Droga e esquema de tratamento	41
4.5	Acompanhamento da letalidade	41
4.6	Eutanásia e coleta de amostras para análises	41
4.7	Análise da função pulmonar	44
4.8	Avaliação de apoptose e eferocitose	44
4.9	Avaliação histológica	45
4.10	Análises estatísticas	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Anexina A1 é importante para o controle do recrutamento celular, promoção de apoptose/eferocitose e maior <i>clearance</i> bacteriano	46
5.1.1	Anexina A1 é importante para o controle da produção de citocinas	47

5.1.2 Anexina A1 é importante para o controle do dano pulmonar durante a pneumonia induzida por <i>E. coli</i>	48
5.2 O receptor FPR-2 é importante para o controle do recrutamento celular, maiores contagens de apoptose/eferocitose e maior <i>clearence</i> bacteriano	50
5.2.1 O receptor FPR-2 é importante para o controle da produção de citocinas	51
5.2.2 O Receptor FPR-2 é importante para redução dos parâmetros associados ao dano pulmonar para a sobrevivência dos animais durante a pneumonia por <i>E. coli</i>	52
5.3 Animais tratados com Ac ₂₋₂₆ apresentaram redução no recrutamento celular, aumento nas contagens de apoptose/eferocitose, e <i>clearence bacteriano</i>	55
5.3.1 Animais tratados com Ac ₂₋₂₆ apresentaram redução dos níveis de citocinas.....	56
5.3.2 Animais tratados com Ac ₂₋₂₆ apresentaram redução dos parâmetros associados ao dano pulmonar e controle do infiltrado inflamatório	57
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO I	81

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças do aparelho respiratório são aquelas definidas como doenças crônicas ou infecciosas que acometem as vias respiratórias superiores ou inferiores, as quais prejudicam a passagem do ar, tanto a nível nasal, quanto a nível pulmonar (WHO, 2022). Essas doenças são desafios para a saúde pública em todo mundo, pois são consideradas importantes causas mundiais de morbi/mortalidade nas diferentes faixas etárias. Segundo o DATASUS (2022), as doenças do trato respiratório foram responsáveis por uma expressiva taxa de óbitos no Brasil em 2020, sendo a pneumonia a maior contribuinte com o total de 67 mil mortes (DATASUS, 2022).

As infecções do trato respiratório são capazes de acometer as vias respiratórias superiores, e também as vias respiratórias inferiores. As infecções das vias respiratórias superiores (IVRS) acontecem de forma frequente, pois essas vias estão em constante contato com microrganismos exógenos, como acontece nas infecções por vírus gripais. No entanto, as IVRS geralmente são mais brandas, quando comparadas às infecções das vias respiratórias inferiores (IVRI), que podem causar doenças graves, com significativo dano pulmonar, e que requerem o tratamento e diagnóstico imediato (AZEVEDO *et al.*, 2015). As IVRIs são as principais contribuintes pela expressiva taxa de mortalidade das infecções respiratórias agudas (IRAs) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

As IVRIs acometem a estrutura funcional pulmonar e facilmente evoluem para infecções mais graves, como acontece na pneumonia. Os principais agentes etiológicos causadores de infecções pulmonares são as bactérias Gram-positivos como *Streptococcus pneumoniae* (ANDRADE *et al.*, 2018) e as bactérias Gram-negativos como *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosas*, além de outros microrganismos como fungos e vírus. A pneumonia é estabelecida pela inflamação pulmonar durante a infecção, em resposta ao agente infeccioso, no propósito de eliminar a infecção (TORRES *et al.*, 2021). O processo infeccioso pode ser caracterizado pela pneumonia adquirida na comunidade (PAC) e pneumonia adquirida no hospital (HAP), ou ainda por pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), de acordo com o ambiente de infecção (WUNDERINK *et al.*, 2021).

Recentemente uma nova doença respiratória infecciosa assola o mundo inteiro, a *Coronavirus Disease – 19* (COVID-19), causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, declarada como pandemia pela OMS em 11 de março de 2020. As infecções virais têm a capacidade

alterar a imunidade do hospedeiro, facilitando o desenvolvimento da coinfeção viral-bacteriana. Nas formas graves de SARS-CoV-2 foi observado que a maioria dos pacientes adquiriu infecção bacteriana secundária (ALMAND; MOORE; JAYKUS, 2017; TETRO, 2020). As infecções pneumocócicas secundárias que ocorrem durante ou após uma infecção viral são frequentemente associadas ao aumento das taxas de mortalidade (SHORT *et al.*, 2012). Coinfecções bacterianas no contexto de pandemias e epidemias virais têm consequências importantes sobre o sistema de saúde, especialmente em grupos de alto risco, como aqueles com imunodeficiência ou imunossupressão (MACINTYRE *et al.*, 2018). Nesse cenário, ficou evidente que a inserção de um novo microrganismo no ambiente pode alterar a prevalência das PACs (SENDER; HENTRICH; HENRIQUES-NORMARK, 2021). A HAP e a PAV são algumas das principais infecções graves em pacientes no ambiente nosocomial, pelas quais as taxas de mortalidade variam entre 20 e 50% respectivamente, e pode chegar a 75% quando a infecção pulmonar é causada por bactérias multirresistentes (BASSETTI *et al.*, 2022). Bastonetes Gram-negativos como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* são os principais microrganismos causadores de pneumonia aspirativa, para os quais a descoberta de novos agentes antimicrobianos é de extrema urgência, pois são considerados potenciais microrganismos multirresistentes aos diversos antibióticos utilizados na clínica (TORRES *et al.*, 2021).

O tratamento da pneumonia adquirida no ambiente nosocomial representa um desafio constante, pois os parâmetros de eficácia e segurança dos antibióticos utilizados estão cada vez mais comprometidos devido à multirresistência de bactérias Gram-negativos (WUNDERINK *et al.*, 2021). As bactérias da família *Enterobacteriaceae* e bactérias Gram-negativas não fermentadoras são causas comuns de HAP e PAV e tem sido associadas aos piores desfechos clínicos pela falha da terapia empírica no início da infecção, devido aos padrões de resistência cada vez mais frequentes pelas bactérias Gram-negativos (BASSETTI *et al.*, 2022). O centro de controle e prevenção de doenças dos EUA identificou *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* multidrogas resistentes (MDR) como ameaças oportunistas e emergentes, pelas as quais comumente desencadeiam pneumonia grave e subsequente sepse (SYED, 2021). Portanto, o estudo da pneumonia causada por estes microrganismos é essencial para descoberta de possíveis intervenções terapêuticas, no intuito de reduzir a taxa de mortalidade por essas infecções.

A inflamação pulmonar desencadeada durante a pneumonia é fisiologicamente orquestrada por mecanismos celulares e mediadores químicos do sistema imune, para eliminar o estímulo infeccioso e restaurar a homeostase tecidual, protegendo o hospedeiro dos danos evocados pela proliferação do patógeno (MEDZHITOV, 2010). A inflamação pulmonar aguda (ALI) desencadeada principalmente na pneumonia por bactérias Gram-negativas, é caracterizada pelo acúmulo de infiltrado leucocitário, principalmente polimorfonucleares (PMN), e pode culminar com a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), causando dano pulmonar irreversível e até levar a morte (KUMAR, 2020). Desta forma, a resposta inflamatória deve ser eficiente e autolimitada, com a progressão para mecanismos de resolução completa da inflamação e eliminação da bactéria (DUFFIN *et al.*, 2010). Por outro lado, mecanismos ineficientes do programa de resolução da inflamação durante a infecção pulmonar leva a inflamação exacerbada, causando intenso dano/disfunção pulmonar e disseminação bacteriana, além de aumentar a gravidade da pneumonia e levar a sepse (TAVARES *et al.*, 2022).

A sepse é um distúrbio clínico complexo decorrente de respostas inflamatórias exacerbadas, caracterizada pela tempestade de citocinas que causa a disfunção múltipla de órgãos, e é a principal causa de morte por pneumonia aspirativa. Na sepse causada por bactérias Gram-negativas, muitas das complicações potencialmente fatais, como por exemplo, a inflamação sistêmica e tempestade de citocinas, são atribuídas ao lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, constituinte da parede celular destes microrganismos (LI *et al.*, 2015). Além disso, o LPS também cria uma barreira de permeabilidade na superfície da célula sendo um dos principais contribuintes para a resistência bacteriana (BERTANI; RUIZ, 2018). Portanto, a pneumonia induzida por bactéria Gram-negativo representa uma grande ameaça aos pacientes hospitalizados, devido a resposta inflamatória exacerbada desencadeada durante a infecção com potencial para sistemização, além do perfil de resistência apresentado por esses microrganismos no ambiente nosocomial (LI *et al.*, 2015).

Nesse contexto, alguns trabalhos clínicos e pré-clínicos têm mostrado a importância da terapia utilizando anti-inflamatórios e/ou moléculas pró-resolutivas, em combinação com a terapia utilizada correntemente na clínica para o tratamento de doenças infecciosas (HOOGENDIJK *et al.*, 2012; SPITE *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2016). Os glicocorticoides são agentes anti-inflamatórios e imunossupressores amplamente usados como

terapia adjuntiva em casos de pneumonia grave, pois são reguladores críticos de respostas inflamatórias, e também de vários processos fisiológicos fundamentais, incluindo homeostase metabólica, proliferação celular, além de regular o metabolismo de lipídios e proteínas (VANDEVYVER *et al.*, 2013). Apesar de apresentar uma boa eficácia anti-inflamatória, o uso de glicocorticoides deve ser criteriosamente avaliado devido vários efeitos adversos apresentados pelo seu uso a longo prazo e alta dose, além de induzir a imunossupressão, e proporcionar maior susceptibilidade à infecção (BEAULIEU; MORAND, 2011). A indução da imunossupressão pode bloquear os mecanismos de resolução da resposta inflamatória e prejudicar a eliminação de patógenos, promovendo maiores danos desencadeados pela inflamação exacerbada. Compreender a farmacologia de resolução que explora tais mecanismos, como mediadores, receptores e vias celulares, contribui para o desenvolvimento de novas oportunidades terapêuticas direcionadas ao hospedeiro para superar doenças inflamatórias (TAVARES *et al.*, 2022). Importante ressaltar, que embora os corticoides sintéticos apresentem essas ressalvas, foram medicamentos utilizados com bastante êxito no tratamento da COVID-19 grave (HORBY *et al.*, 2021).

Sabe-se que a resolução da inflamação é um processo ativo, que envolve a produção de vários mediadores pró-resolutivos. Dentre estes, podemos citar moléculas de natureza lipídica como lipoxinas, maresinas, resolvinas, protectinas e também moléculas de natureza proteica como as proteínas Anexina A1 (AnxA1) e GILZ (*Glucocorticoid Induced Leucine Zipper*), dentre vários outros. Estes mediadores agem via receptores específicos e inibem vias de sobrevivência de neutrófilos, estimulando sua apoptose, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a transmigração de monócitos de forma não inflamatória, e estimulam a capacidade dos macrófagos em fagocitar debris e células apoptóticas em um evento denominado eferocitose (SOUSA *et al.*, 2013). Além disso, a diminuição da carga bacteriana devido a indução da maior capacidade fagocítica de macrófagos também é uma característica importante destas moléculas pró-resolutivas, visto que são liberadas logo no início da inflamação, em um mecanismo de pró-resolução de extrema importância no contexto das doenças infecciosas (CHEN *et al.*, 2020; CHIANG *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2022; ZAIDAN *et al.*, 2022).

A expressão da proteína AnxA1 é constitutiva e particularmente abundante no citoplasma de células responsivas da imunidade inata como, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais (HEADLAND; NORLING, 2015). Essa proteína exerce importantes funções

imunomodulatórias em diversos modelos pré-clínicos de inflamação (SUGIMOTO, Michelle A. *et al.*, 2016a). Porém os trabalhos que abordam o papel da AnxA1 em modelos de infecção pulmonar por bactérias Gram-negativos ainda são incipientes. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente a efetividade da via AnxA1/FPR-2 em controlar a resposta inflamatória e disseminação bacteriana na pneumonia experimental induzida por bactéria Gram-positivo, *Streptococcus pneumoniae*. Foi mostrado que o tratamento da pneumonia pneumocócica experimental com o peptídeo derivado da porção N-terminal da AnxA1 denominado Ac₂₋₂₆, promoveu proteção da pneumonia pneumocócica através da modulação da inflamação e dano pulmonar associado, além de diminuir a carga bacteriana por meio da maior capacidade fagocítica dos macrófagos frente aos pneumococos (MACHADO *et al.*, 2020). Assim, diante do desafio para tratamento adjuntivo nas infecções pulmonares causadas por bactérias Gram-negativos, a proposta do presente trabalho é investigar o papel da molécula pró-resolutiva AnxA1 e seu receptor de formil peptídeo 2 (FPR-2), em modelos de pneumonia induzida pela bactéria Gram-negativo *Escherichia coli* utilizando-se camundongos selvagens *wild type* e deficientes para expressão de AnxA1 ou FPR-2, e posteriormente avaliar o efeito terapêutico do Ac₂₋₂₆ na fisiopatologia da infecção. Espera-se que o estudo da pneumonia causada por esse microrganismo, diante de suas complexidades como os fatores de virulência e a resistência bacteriana, permita identificar indutores mais eficazes no controle do processo infeccioso/inflamatório, e defina vias moleculares envolvidas, pelas quais se tornam favoráveis o desenvolvimento de novas drogas.

1.1 *Escherichia coli*

E. coli é um importante gênero da família *Enterobacteriaceae*, que vive como um patobionte no trato gastrointestinal de humanos e muitos animais. Morfologicamente, *E. coli* é caracterizada como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos e apresentam flagelos monotríqueos e pili em sua superfície (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Este simbiote pode adquirir uma mistura de elementos genéticos móveis (MGE) contendo genes que codificam fatores de virulência e tornam-se patógenos etiológicos de graves infecções intestinais e extraintestinais (LUDDEN *et al.*, 2021). As cepas de *E. coli* patogênicas intestinais são geralmente divididas naquelas que causam diarreia por: (i) expressar toxina estável ou termoestável, caracterizada como *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); (ii) invasão da mucosa intestinal, caracterizada como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); (iii) causar lesões aderentes obstrutivas na mucosa intestinal, caracterizada como *E. coli* enteropatogênica

(EPEC) (RILEY, 2014). Por outro lado, as cepas patogênicas de *E. coli* extraintestinais (ExPEC) são compostas por várias linhagens e responsáveis pela maioria das infecções extraintestinais em todo o mundo, sendo uma das principais causas de infecção do trato urinário (ITU), como também um dos principais microrganismos associado à sepse (NICOLAS-CHANOINE; BERTRAND; MADEC, 2014; RILEY, 2014)

A ITU é a principal infecção desencadeada por ExPEC, seja por infecções nosocomiais ou infecções adquiridas na comunidade, mas frequentemente, essa cepa também está associada a infecções nos tecidos moles, como por exemplo, peritonite, e no sistema nervoso central, como por exemplo, meningite neonatal, pelas quais elevadas taxas de mortalidade são apresentadas anualmente, por complicações de bacteremia ou síndrome de sepse (NICOLAS-CHANOINE; BERTRAND; MADEC, 2014). Mutações em cepas de ExPEC estão associadas à infecções graves e maior incidência de resistência aos antibióticos. A maioria dos genes de resistência é adquirida por transferência horizontal de plasmídeos entre outros MGEs. O aumento da resistência pode estar ligado com a disseminação mundial de um clone específico de ExPEC, identificado como *E. coli* sequencia tipo 131 (ST131) (HUMMERS-PRADIER *et al.*, 2005). O clone multirresistente ST131, pertence ao grupo filogenético B2 e ao sorotipo O25b:H4 e possui combinações e números variáveis de genes de virulência, sendo estes, responsáveis por seu potencial patogênico e disseminação global (DA CRUZ CAMPOS *et al.*, 2020). Atualmente o grupo clonal ST131 é predominante entre os isolados de ExPEC e seus principais fatores de virulência, incluem adesinas, toxinas, sideróforos e capsulas do grupo 2. Sendo assim, esse grupo clonal combina genes de resistência e virulência que foram detectados com pouca frequência quando comparados a outros importantes isolados de ExPEC como por exemplo, o grupo ST73-B2 e ST95-B2 (DAHBI *et al.*, 2014).

Outros mecanismos moleculares, de resistências, são apresentados em cepas multirresistentes de *E. coli*, tais como surtos de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e produção de carbapenemase, pelos quais são considerados constantemente como sérios desafios na clínica. A incidência de carbapenemase e β -lactamase são importantes mecanismos moleculares de resistência a serem estudados, dado a capacidade de resistência às principais classes de antibióticos utilizados na clínica, como penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas fluoroquinonas, dentre outros. Os principais mecanismos de resistência são desencadeados pela bomba de efluxo, pela permeabilidade reduzida com diminuição de porinas, pela alteração de transpeptidases e a inativação por β -lactamases, promovendo ainda

mais o descontrolo na disseminação destes microrganismos (DURANTE-MANGONI; ANDINI; ZAMPINO, 2019; SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020). Além do mais, cepas de *E. coli* produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBLEC) é uma causa crescente de infecções do trato urinário no âmbito hospitalar, e essas infecções estão cada vez mais associadas à desfechos clínicos graves que levam ao aumento da mortalidade, hospitalização prolongada e elevados custos médicos (IKEDA *et al.*, 2012). A prevalência da resistência aos antibióticos orais beta-lactâmicos de primeira linha, amplamente utilizados para tratar infecções por *E. coli*, aumenta constantemente, e essas características fenotípicas de resistência também estão associadas ao LPS constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas (DURANTE-MANGONI; ANDINI; ZAMPINO, 2019).

O LPS é o principal fator de virulência constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas relacionado com o desenvolvimento de ALI, caracterizado pelo acúmulo de células e mediadores pró-inflamatórios, que facilmente leva ao dano pulmonar. Por outro lado, a disponibilidade de antibióticos eficazes, principalmente para o tratamento de infecções nosocomiais, está cada vez mais escasso devido à crescentes taxas de disseminação e resistências, principalmente entre os membros da família enterobacteriaceae e bastonetes Gram-negativos não fermentadores. Dados obtidos do *Robert Koch Institute* mostram que cepas de microrganismos Gram-negativos multirresistentes (MRGN) tornou-se relativamente comum na Alemanha. Os MRGN *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Pseudomonas aeruginosa* são encontrados em 3,2 a 7,1% dos pacientes admitidos em ambulatórios, 6,6 a 9,8% em enfermarias comuns, e 11,5 a 13,4% em unidades de terapia intensiva (FRITZENWANKER *et al.*, 2018).

A incidência de MRGN em unidades de terapia intensiva se torna um agravante principalmente entre os pacientes com o sistema imunológico comprometido, ou aqueles com o epitélio danificado sob ventilação mecânica, pois são altamente suscetíveis às infecções por MRGN, e o tratamento efetivo se torna cada vez difícil (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Relata-se que a PAV é uma causa comum em unidades de terapia intensiva, definida pela infecção pulmonar em pacientes expostos à ventilação mecânica invasiva por mais de 48h após a intubação (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020). Embora a maioria das cepas de *E. coli* responsáveis por infecções extraintestinais sintomáticas tenham sido extremamente estudadas, os estudos sobre cepas de *E. coli* responsáveis por pneumonia são incipientes, especialmente no contexto de clones potencialmente virulentos, como, por exemplo, ST131.

Dados recentes mostram que enterobacteriaceas identificados como MRGN, incluindo *E. coli*, são agentes etiológicos frequentemente associados a PAV (LA COMBE *et al.*, 2019). Portanto, *E. coli* tem representado um modelo crucial no estudo da pneumonia induzida por bactéria Gram-negativo pela sua interface estrutural e microbiológica, como também pela sua versatilidade metabólica e perfil de resistência. No intuito de compreender interações peculiares com o sistema imunológico, principalmente através do reconhecimento do LPS pelas células da imunidade inata, os resultados obtidos com este estudo poderão referenciar novos estudos com outros microrganismos Gram-negativos que tenham epidemiologia mais relacionada com a pneumonia, principalmente quando adquiridas no ambiente hospitalar.

1.1.1 Tratamento da pneumonia induzida por *E. coli*

O tratamento da pneumonia induzida por bactérias Gram-negativos, no ambiente nosocomial é amplamente realizado por carbapenêmicos. Porém, o aumento do uso de carbapenêmicos levou a um aumento na prevalência de bactérias Gram-negativos resistente a essa classe de antibióticos. Para que o tratamento seja eficaz e específico, é importante que além do diagnóstico, a identificação bacteriana e o padrão de sensibilidade da cepa em específico seja realizada. O diagnóstico clínico consiste na avaliação dos sintomas, nas manifestações sistêmicas e no exame físico. Sendo recomendado também uma radiografia de tórax para avaliar o nível de comprometimento tecidual e a gravidade da doença. A identificação bacteriana consiste em encontrar bastonetes Gram-negativos curtos nas amostras coletadas. A diferenciação entre enterobacteriaceae e bastonetes Gram-negativos não fermentadores é realizada após cultivo da amostra em meio de cultura seletivo e diferencial, e verificação do metabolismo do microrganismo por meio da fermentação ou oxidação da glicose. Além disso, é realizada a prova bioquímica de citocromo oxidase para exclusão de enterobactérias (todos os gêneros não possuem a citocromo oxidase) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Atualmente é preconizado que o tratamento empírico com antibiótico em casos de HAP e PAV deve ser apropriado (guiado pelo teste de sensibilidade *in vitro*) e iniciado o mais cedo possível. Por outro lado, a probabilidade de receber um tratamento empírico inadequado para infecções causadas por MRGN, mesmo com terapia combinada, é constantemente crescente (ZARAGOZA *et al.*, 2020). Estudos mostram que cepas virulentas de *E. coli*, principalmente aquelas pertencentes ao grupo filogenético B2 associadas às PAV apresentam resistência aos principais antibióticos utilizados na clínica, como por exemplo, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, entre

outros (LA COMBE *et al.*, 2019). Em casos de pneumonia grave, nos quais o tratamento e a reposição volêmica não apresentam resultados, tem sido recomendada a utilização de glicocorticoides como terapia adjuntiva (MORALEDA *et al.*, 2021). Os glicocorticoides são os medicamentos mais importantes para o tratamento de muitas condições inflamatórias e representam a primeira exploração bem-sucedida de um mediador anti-inflamatório endógeno, o cortisol (SOUSA *et al.*, 2013, Vago *et al.* 2021). No entanto, seu efeito terapêutico pode ser muitas vezes acompanhado por graves efeitos adversos, incluindo imunossupressão, principalmente quando utilizados em altas dosagens ou por longo período de tempo, os quais impossibilitam a adesão e eficácia do tratamento. Os principais efeitos adversos dos glicocorticoides parecem ser dependentes da expressão gênica, ou seja, da transativação. Entretanto, a transativação induzida por receptores de glicocorticoides é indispensável para suas propriedades anti-inflamatórias (VANDEVYVER *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstram que diversas proteínas anti-inflamatórias com atividade pró-resolutiva, dentre elas AnxA1 e GILZ, são induzidas por transativação dependente do receptor de glicocorticoide (GR). Neste contexto, mediadores pró-resolutivos têm chamado atenção para o seu uso na clínica, como estratégia terapêutica, uma vez que mimetiza as funções imunomoduladoras dos glicocorticoides, mas que limita os efeitos metabólicos, considerados como efeitos adversos (CHENG; MORAND; YANG, 2014). O conhecimento das propriedades pró-resolutivas destas e de outras proteínas induzidas por glicocorticoides pode levar ao desenvolvimento de fármacos que extrairiam as características benéficas dos glicocorticoides, por induzir os mecanismos de resolução da resposta inflamatória (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

1.2 Reconhecimento de patógenos no pulmão

A anatomia e a fisiologia do sistema respiratório são bastante complexas, compostas por vários elementos que atuam em conjunto, e responsáveis por uma variedade de funções fisiológicas, sendo dividido em trato respiratório superior e inferior. O trato respiratório superior compreende a cavidade oral e nasal, boca, faringe e laringe, enquanto o trato respiratório inferior inclui a traqueia, brônquios e pulmões, que são subdivididos em bronquíolos e alvéolos (Figura 1). As infecções do trato respiratório inferior (bronquite, bronquiolite e pneumonia) representam uma grande ameaça à saúde, sendo a pneumonia a causa mais comum de mortalidade no mundo (TAVARES; GALVÃO; FERRERO, 2022).

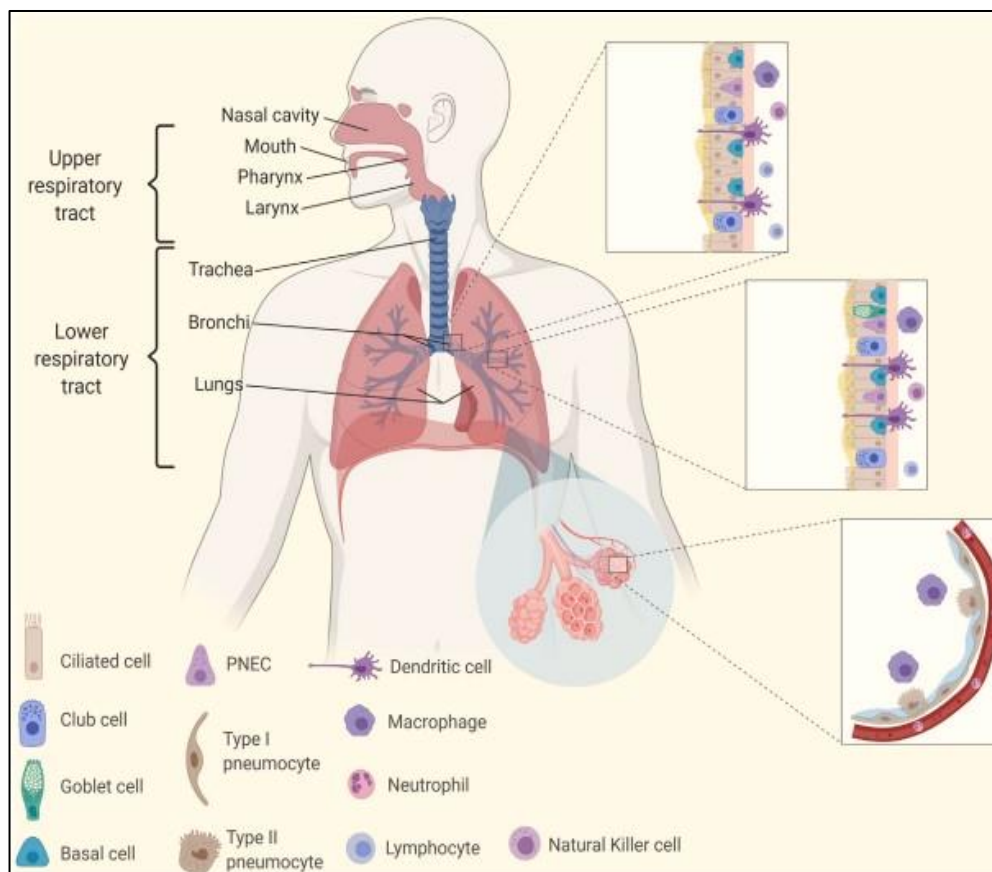


Figura 1: Anatomia do sistema respiratório. O sistema respiratório é dividido didaticamente em vias superior e inferior. O trato respiratório superior compreende as cavidades oral e nasal (boca, laringe e faringe). O trato respiratório inferior inclui a traqueia, os brônquios e os pulmões (bronquíolos e alvéolos). Em toda a extensão do trato respiratório o sistema imunológico está em constante vigilância. Linfócitos residentes, células dendríticas, e macrófagos alveolares são importantes leucócitos vigilantes que impedem os processos infecciosos (TAVARES; GALVÃO; FERRERO, 2022).

Como primeira linha de defesa do hospedeiro, o epitélio das vias aéreas e as células da imunidade inata, como os macrófagos alveolares, desempenham um papel crítico na limitação da infecção. Eles reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), bem como os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), através da ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) transmembranais ou ainda citoplasmáticos (DENNING *et al.*, 2019)

Diferentes classes de famílias PRRs foram identificadas, e essas famílias incluem proteínas transmembranais como os receptores Toll-like (TLRs) e os receptores de lectina tipo C (CLRs), bem como proteínas citoplasmáticas, como os receptores de gene induzido pelo ácido retinóico (RLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs). Esses receptores não são expressos apenas em macrófagos e células dendríticas, mas também em várias outras células do sistema

imune e células epiteliais, e sua ativação levam à expressão transcricional de genes codificadores de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e proteínas antimicrobianas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Desde a descoberta dos TLRs a especificidade do reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato ficou ainda mais evidente. As vias de sinalização de TLR são constantemente estudadas após a descoberta de moléculas adaptadoras como TIRAP e o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88). A identificação subsequente de outras moléculas adaptadoras pelo domínio TIR, mostrou que os TLRs recrutam seletivamente padrões moleculares distintos, responsáveis por respostas imunológicas específicas aos microrganismos. Neste contexto, existem sinalizações específicas dependentes de TLRs entre as células do sistema imune, como por exemplo, as células dendríticas e os monócitos possuem vias de sinalização únicas, que regulam as respostas antivirais, que provavelmente estão ausentes em outros tipos celulares (KAWAI; AKIRA, 2010).

Os TLRs são caracterizados por repetições ricas em leucina N-terminal e uma região transmembranar, seguida por uma região citoplasmática capazes de reconhecer principalmente componentes da membrana microbiana como lipídios, lipoproteínas e proteínas. O TLR4 é um importante receptor da família Toll na resposta imune inata frente às infecções por bactérias Gram-negativas, por reconhecer o LPS como principal PAMP associado à bactéria e desencadear sinalizações extremamente bem estabelecidas, pelas quais incluem primeiramente a via de ativação transmembranar dependente de MyD88 pelo eixo TIRAP – MyD88, como também a via de ativação endossomal após a internalização do complexo TLR4-MD2-LPS no citoplasma. Como MyD88 faz parte da via de sinalização de diversos receptores do tipo Toll e sua atividade não é redundante à atividade de outra molécula adaptadora, ela se torna crucial na resposta inflamatória (KOPPE; SUTTORP; OPITZ, 2012).

A ativação de TLRs pela via dependente de MyD88 resulta na indução de genes com papéis críticos na modulação transcricional de NF- κ B. Elementos de modulação incluem a proteína I κ B α , que funciona como um inibidor citoplasmático para as subunidades p50-p65 de NF- κ B. Após a ativação e fosforilação de proteínas IKKs, estas fosforilam I κ B α levando o inibidor à degradação proteossomal com posterior liberação das subunidades de NF- κ B para translocarem para o núcleo e promoverem transcrição gênica de várias moléculas pró-inflamatórias (Figura 2) (JIANG *et al.*, 2018). De fato, após o reconhecimento do patógeno e a regulação positiva para a translocação nuclear de NF- κ B, os macrófagos imediatamente

começam a sintetizar TNF- α e várias outras quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, enquanto o endotélio começa a sintetizar E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 no propósito de recrutar a majoritária célula efetora da imunidade inata, o neutrófilo (YIPP *et al.*, 2017).

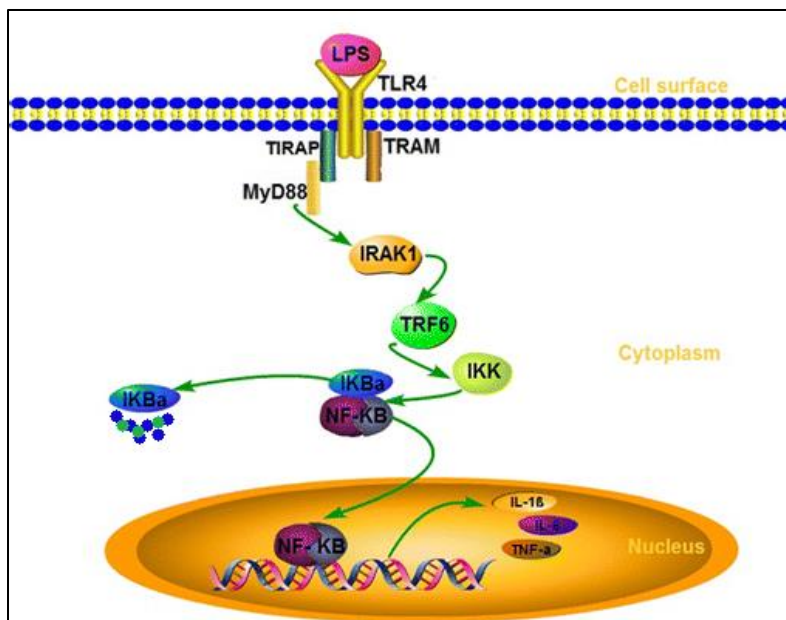


Figura 2: Reconhecimento de LPS por TLR. O fator MyD88 é a primeira proteína adaptadora recrutada para TIRAP, seguido pela ativação de quinase 1 associada ao receptor IL-1 (IRAK1) e fator 6 associado ao receptor TNF (TRAF6). Posteriormente, o IKK β fosforilado/ativado, fosforila I κ Ba levando à sua degradação e posterior e ativação de NF- κ B, um dos fatores de transcrição que regula a expressão de uma série de genes alvos envolvidos na inflamação, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (JIANG *et al.*, 2018).

Na infecção pulmonar por bactérias Gram-negativo os principais PRRs envolvidos são os receptores da família Toll (TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9), além dos receptores da família NOD (NOD2 e AIM2). O TLR2 reconhece lipoproteínas, o TLR5 reconhece flagelina, o TLR9 reconhece DNA bacteriano contendo o motivo CpG não metilado, e, como dito anteriormente, o TLR4 reconhece o LPS (KAWAI; AKIRA, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). TLR2 participa na eliminação bacteriana em estágios mais avançados da infecção, porém este também ativa a produção de mediadores pró-inflamatórios, os quais danificam a integridade da barreira epitelial promovendo a translocação bacteriana. TLR2 e TLR4 desempenham funções importantes no recrutamento de neutrófilos e produção das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias CXCL1/2, TNF- α , IL-1 β , e IL-6 (TOMLINSON *et al.*, 2014). TLR9 parece não ser essencial para a produção de citocinas. Porém esse receptor é importante para habilidade dos macrófagos alveolares de fagocitarem e matarem as bactérias, sendo então crucial para o *clearance* bacteriano (ALBINGER *et al.*, 2007).

Os NLRs localizados no citoplasma são outro grupo de receptores envolvidos na infecção pulmonar, dentre eles o NOD2 é responsável pela detecção dos fragmentos de peptidoglicano, os quais são apresentados após a fagocitose da bactéria por macrófagos. Após o reconhecimento destes fragmentos tem-se a ativação de NF- κ B para produção de citocinas e principalmente indução da produção de CCL2, uma importante quimiocina envolvida no recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção. Além disso, com ativação de AIM2 pelo reconhecimento de DNA bacteriano inicia-se a montagem do inflamassoma, um complexo imune inato que leva a ativação de caspases inflamatórias, e desencadeia a maturação e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β /IL-18, como também a piroptose, uma forma pró-inflamatória de morte celular (LUGRIN; MARTINON, 2018). Portanto, de maneira geral pode-se afirmar que NOD2 e AIM2 também são essenciais na resposta inflamatória contra infecções pulmonares.

1.2.1 Resposta inflamatória durante a pneumonia por Gram-negativo

A inflamação é uma resposta da microvasculatura, que exerce funções fisiológicas contra estímulos nocivos, como lesões e infecções. Com base nos achados macroscópicos a inflamação é descrita por cinco sinais cardinais: calor, rubor, edema, dor, e perda de função (Figura 1) (MEDZHITOV, 2010).



Figura 3: Sinais Cardinais da inflamação. Cornelius Celsus, no século I D.C., descreveu os sintomas clínicos da inflamação, reconhecidos atualmente como os quatro sinais cardinais da inflamação: o calor (associado com o aumento do fluxo sanguíneo e hipertermia), o rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (edema causado por aumento da permeabilidade microvascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), dor (devido a sinalizações e alterações nas terminações nervosas). Um quinto sinal foi adicionado posteriormente por Rudolf

Virchow em 1858, a perda da função, associada à disfunção dos órgãos envolvidos neste processo (MEDZHITOV, 2010) (Fonte: (ETIENE; VIEGAS; VIEGAS 2021)).

Como mencionado anteriormente, após o reconhecimento do patógeno, vias sinalizadoras intracelulares são ativadas e culminam com a liberação de mediadores inflamatórios que resultam na quimiotaxia dos leucócitos e permite a interação de células circulantes com as células endoteliais, possibilitando a transmigração dos leucócitos para o sítio inflamatório. A interação entre os fatores quimiotáticos e seus receptores resulta na ativação da expressão inúmeras moléculas pertencentes às vias sinalizadoras intracelulares em células epiteliais que são fundamentais para manutenção da resposta inflamatória. Esses mediadores quimiotáticos e pró-inflamatórios liberados por macrófagos, células dendríticas e células epiteliais no tecido lesado ativam os leucócitos circulantes e induzem mudanças rápidas nas propriedades de adesão desses e das células endoteliais (VAGO *et al.*, 2015). Quase imediatamente, pelo aumento da permeabilidade vascular ocorre a formação de edema e facilita o recrutamento de leucócitos da circulação periférica para o tecido (TAVARES; GALVÃO; FERRERO, 2022).

Os neutrófilos são os leucócitos majoritariamente recrutados nos estágios iniciais da infecção, seguido pelos monócitos. As quimiocinas CXCL1 e CXCL2 são consideradas quimioatrativas canônicas para neutrófilos e são produzidas precocemente durante a infecção pulmonar. Os neutrófilos recrutados exercem importantes funções efetoras para o *clearance* bacteriano como, degranulação e liberação de proteases e proteínas antimicrobianas estocadas em seus grânulos citoplasmáticos, fagocitose de bactérias e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MIZGERD, 2018). Os neutrófilos maduros têm uma meia vida curta na circulação e morrem rapidamente por apoptose. Após o recrutamento para tecidos inflamados, a vida útil dos neutrófilos é aumentada por meio da ativação de vias de sobrevivência celular em resposta aos PAMP's, DAMP's e citocinas produzidas no *milieu* inflamatório. O LPS da parede de bactérias Gram-negativas induz o aumento de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos facilitando a sua apreensão no tecido infectado (FILEP, 2022; YIPP *et al.*, 2017).

A ativação apropriada e auto-limitada de neutrófilos é essencial no controle da infecção causada por *E. coli*. Um dos mecanismos de ativação é evidenciado pelo papel da protease neutrofílica, elastase. A incubação de elastase com *E. coli* leva à lise celular bacteriana, possivelmente devido à sua capacidade de degradar várias proteínas-chaves na membrana externa da bactéria (PECHOUS, 2017). Além disso, em resposta aos estímulos inflamatórios,

os neutrófilos podem extrudir armadilhas extracelulares (NETs). A formação de NETs é um mecanismo pelo qual os neutrófilos liberam do núcleo fibras de cromatina descondensada do DNA e entrelaçadas com várias proteínas, incluindo histonas, elastase, mieloperoxidase (MPO) e MMP-9, em um esforço para capturar e matar a bactéria. Este processo pode ser induzido por vários estímulos inflamatórios, como a liberação de IL-8 ou diretamente pela detecção do LPS (LEE *et al.*, 2017; YIPP *et al.*, 2017). Apesar de contribuir para o *clearance* bacteriano, a presença prolongada das NETs e proteases podem danificar o tecido infectado, e no modelo de pneumonia desencadear graves lesões pulmonares (PECHOUS, 2017).

Os macrófagos recrutados também são importantes no controle de patógenos pulmonares. Estes macrófagos são derivados de monócitos circulantes, e após chegarem ao parênquima pulmonar se diferenciam e são ativados para exercer suas funções efetoras, como a fagocitose da bactéria, e a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, auxiliando na defesa inata do pulmão (PERCOPO *et al.*, 2014; SAMARASINGHE *et al.*, 2017). Além disso, essas células desempenham um papel importante na resposta imune adaptativa, como apresentadores de antígenos aos linfócitos, sendo um elo importante para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (NATHAN; DING, 2010).

Em adição à sua função efetora, no reconhecimento e fagocitose para indução da resposta inflamatória e controle do patógeno nos pulmões, os macrófagos também estão envolvidos no processo de resolução da inflamação. De fato, essas células são essenciais para a remoção dos neutrófilos e outras células apoptóticas, pelo processo de eferocitose, durante a remodelação e indução de reparo do epitélio lesado, bem como pela ativação do sistema imune. Dessa forma, essas diferentes características funcionais dos macrófagos também estão relacionadas a diferentes aspectos fenotípicos. O fenótipo apresentado pelos macrófagos é direcionado pelas citocinas do *milieu* inflamatório e pela fagocitose de bactérias ou células apoptóticas (MOSSER; EDWARDS, 2008).

A fim de se identificar os diferentes fenótipos de macrófagos, os padrões de expressão de marcadores de superfície celular específicos foram descritos. Nesse sentido, macrófagos do tipo M1 aumentam a expressão de moléculas de ativação como CD80, CD86, e CD16/32 e secretam citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, quando polarizados para o fenótipo tipo M2, os macrófagos aumentam a expressão de arginase-1 (Arg-1), receptor de manose (CD206) e aumentam a produção de quimicinas e citocinas anti-inflamatórias como CCL17, CCL22, IL-10 e TGF- β , desempenhando papel importante na atenuação da inflamação e no

reparo tecidual (YUNNA *et al.*, 2020). Além da estimulação dos macrófagos por citocinas específicas, outro mecanismo necessário para a polarização de M1 para M2 é o engolfamento de células apoptóticas - evento clássico denominado eferocitose (KUMARAN SATYANARAYANAN *et al.*, 2019). As células apoptóticas geram sinais que induzem o processo de apoptose e sua eferocitose pelos macrófagos, limitando assim os danos pró-inflamatórios evocados pela necrose celular.

No estágio tardio do reparo tecidual, a eferocitose de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos leva à polarização dessas células para o fenótipo denominado Mres (Macrófago resolutivo) que está diretamente relacionado ao processo de resolução da resposta inflamatória, pela produção e liberação de mediadores pró-resolutivos (KUMARAN SATYANARAYANAN *et al.*, 2019; MICHAELI *et al.*, 2018). De forma mais tardia, os linfócitos migram para o pulmão a fim de somar e direcionar os mecanismos de defesa do sistema imune para o objetivo final que é o *clearance* bacteriano no pulmão. Os linfócitos T CD4⁺ são recrutados precocemente e contribuem para a ativação de macrófagos ao produzir citocinas pró-inflamatórias com atividade antimicrobiana, como INF- γ que estimula o *killing* da bactéria internalizada (HIRST *et al.*, 2004).

Em suma, a resposta inflamatória aguda induzida por bactérias Gram-negativas nos pulmões apresenta uma dualidade. É essencial para o efetivo controle da proliferação e disseminação do patógeno, porém deve ser finamente regulada, uma vez que a ativação exagerada dos diversos mecanismos antibacterianos descritos aqui pode causar intenso dano tecidual, disfunção pulmonar, e até mesmo ser fatal para o hospedeiro. Nesse sentido, a indução da resolução da inflamação é tão essencial quanto o início da resposta inflamatória. Recentemente, tornou-se evidente que os programas de resolução coordenada se iniciam logo após o começo da resposta inflamatória a fim de garantir um posterior retorno da homeostase tecidual (SERHAN; SAVILL, 2005; SUGIMOTO *et al.*, 2016). Como mencionado anteriormente, o mecanismo de resolução da resposta inflamatória é um processo ativo, coordenado pela secreção endógena de vários mediadores químicos incluindo proteínas, lipídios e ácidos graxos de cadeia curta, coletivamente chamados de moléculas pró-resolutivas. Essas moléculas geralmente atuam através de receptores transmembranares ligados à proteína G e induzindo os sinais cardinais da resolução caracterizados como: (i) remoção de microrganismos, células mortas e debris; (ii) restauração da integridade e perfusão vascular; (iii) regeneração tecidual; (iv) remissão da febre e (v) alívio da dor

inflamatória (BASIL; LEVY, 2016). Os mecanismos celulares e moleculares da inflamação e sua resolução são descritos na Figura 4.

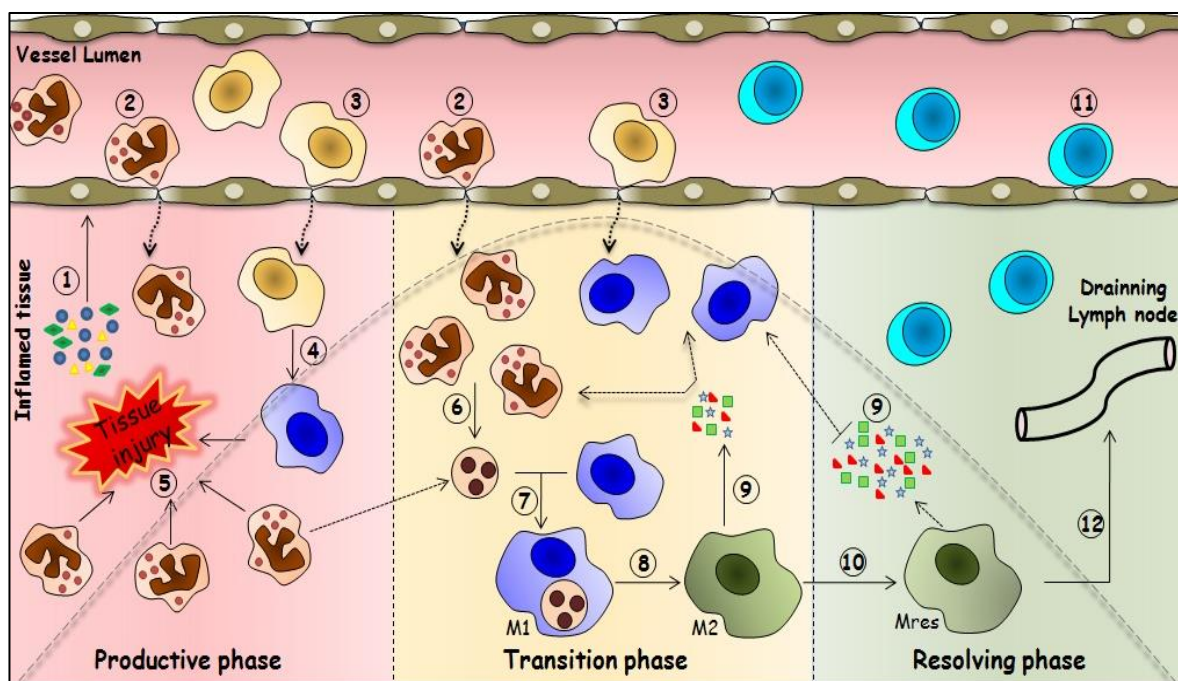


Figura 4: Série orquestrada de eventos que levam à resolução do processo inflamatório agudo. A lesão (estéril ou infecciosa) leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou PAMPs) pelas células residentes (macrófagos teciduais, células epiteliais e células dendríticas) as quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios, entre eles citocinas e moléculas de adesão (1). Leucócitos polimorfonucleares, sobretudo neutrófilos, são as primeiras células da circulação sanguínea, que migram e atravessam o endotélio vascular para o tecido inflamado após a expressão de moléculas de adesão (selectinas e integrinas) pelas células epiteliais ativadas (2), seguido por monócitos (3). Monócitos no sítio inflamatório se diferenciam em macrófagos e são ativados para exercer suas funções fagocíticas (4). Com a progressão da resposta inflamatória, há intenso influxo de leucócitos para o tecido. Na fase de transição da inflamação, a apoptose é induzida por sinais pró-resolutivos produzidos desde o início da resposta inflamatória (6), e subsequente eferocitose por macrófagos teciduais e polarizados. Durante a eferocitose, macrófagos mudam seu fenótipo de M1 para M2 (8). Macrófagos M2 são altamente eferocíticos e produzem moléculas anti-inflamatórias (tais como IL-10, TGF- β e INF- β) e mediadores pró-resolutivos (9). Tais mediadores tem o potencial para inibir o recrutamento adicional de PMN, intensificar a migração de monócitos e ampliar 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. O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, de mediadores pró-resolutivos e anti-fibróticos por Mres, induzem a repovoação de 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).

1.2.2 O eixo pró-resolutivo Anexina A1/FPR-2 na resposta inflamatória

A proteína AnxA1, conhecida também como lipocortina 1, é um dos membros da superfamília das anexinas, que é constituída por pelo menos 13 proteínas estruturalmente semelhantes (GERKE; MOSS, 2002). Caracterizada como um mediador pró-resolutivo

induzida por glicocorticoides, AnxA1 foi inicialmente descrita como inibidora da ação da enzima fosfolipase A2 (FLOWER; BLACKWELL, 1979).

Na sua estrutura intacta AnxA1 tem o peso molecular de 37 kDa e é composta por 346 aminoácidos formando 4 sequências repetidas e dois domínios estruturais: uma extremidade carboxílica (C-terminal) com maior grau de conservação entre as proteínas desta família, e uma extremidade amino terminal (N-terminal) que é caracterizada como promotora da ação anti-inflamatória dessa proteína (LEE *et al.*, 2006). Embora a proteína não seja detectada no plasma, altos níveis de expressão são encontrados de forma constitutiva e particularmente abundantes no citoplasma de células epiteliais, monócitos e macrófagos (HEADLAND; NORLING, 2015). Após estímulo por glicocorticoides, em poucos minutos a proteína é fosforilada e liberada para o meio extracelular. Os mecanismos moleculares responsáveis por essa secreção rápida são específicos de cada célula, por um dos seguintes mecanismos: por ativação do transportador ABC (ATP-binding cassette), fosforilação do resíduo de serina na porção N-terminal, ou fusão de grânulos de gelatinase com a membrana plasmática (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). Estudos demonstraram que os neutrófilos também podem expressar AnxA1, estocar em grânulos e liberar como um componente de vesícula extracelular (LEONI *et al.*, 2015; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009) (Figura 5).

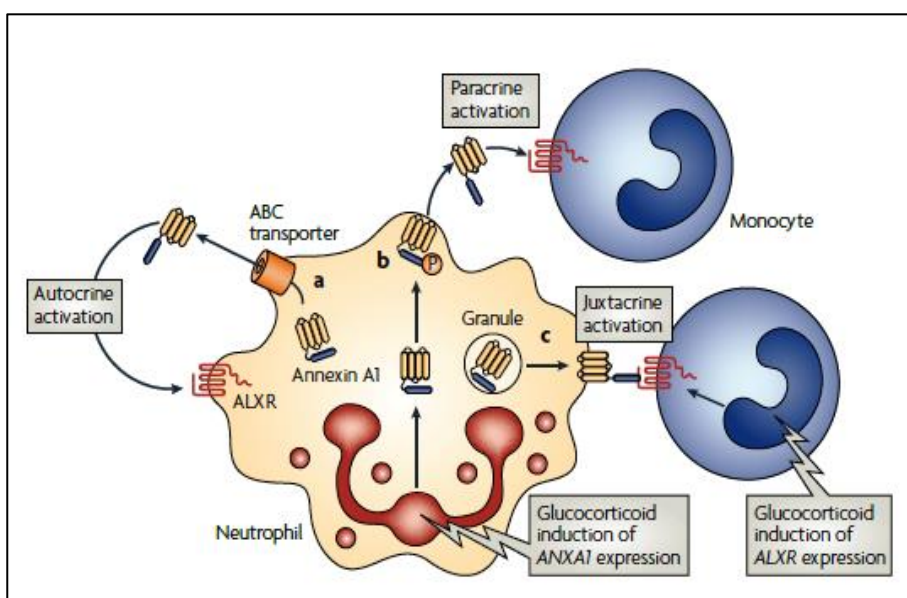


Figura 5: Mobilização da Anexina A1 em células ativadas. Após a ativação celular por meio da adesão a monocamada de células endoteliais, a Anexina A1 citoplasmática é mobilizada para a membrana plasmática. Dependendo do tipo celular, a Anexina A1 é então externalizada e/ou secretada por um dos três mecanismos: Pela ativação do transportador ABC (a); Através da fosforilação do resíduo de serina N-terminal seguido de centralização na membrana para domínios lipídicos específicos, antes de se mover para a camada externa e ser secretada (b); ou através da fusão de grânulos contendo Anexina A1 com a membrana plasmática, seguida de liberação da proteína, expondo seu domínio N-terminal (c) (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

Após ser expressa e secretada para o meio extracelular, o domínio N-terminal da AnxA1 liga-se ao receptor de formil peptídeo 2 (FPR-2, um membro da família de receptores formil acoplados a proteína G (FILEP, 2022)). Em humanos foram identificados três membros da família dos receptores FPRs, composta por FPR-1, FPR-2, FPR-3 e em camundongos a família é composta por 8 membros, sendo os principais: FPR-1 homólogo ao FPR-1 humano e FPR-2 e FPR-3, os quais são estruturalmente semelhantes ao FPR-2 humano. Essa família de receptores se liga a vários ligantes, como por exemplo, FPR-1 reconhece peptídeos N-formilados e desencadeia respostas pró-inflamatórias (DORWARD *et al.*, 2015). FPR-2 reconhece com baixa afinidade fMLP (*N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*), estímulo bacteriano pró-inflamatório. Por outro lado, FPR-2 reconhece com alta afinidade diversos ligantes como peptídeos, proteínas e lipídios, incluindo AnxA1, Lipoxina A4 e Resolvina D1, desencadeando respostas pró-resolutivas (COORAY *et al.*, 2013; FILEP, 2022). O receptor FPR-3 está distribuído em pequenas vesículas intracelulares e reconhece somente o F2L (peptídeo derivado da proteína de ligação à heme), entretanto, pouco se sabe sobre sua função (RABIET *et al.*, 2011). A sinalização de FPR-2 induzida pela AnxA1 envolve a fosforilação transitória da MAPK ERK1/2 (*Extracellular-regulated kinase*). A fosforilação de ERK1/2 está associada a um rápido aumento na concentração intracelular de cálcio (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

O domínio N-terminal caracterizado como região promotora da ação pró-resolutiva de AnxA1 é composto por 44 aminoácidos, dos quais os 26 primeiros aminoácidos formam dupla hélice. Essa região é suficiente para mimetizar a ação extracelular da proteína intacta, visto que o peptídeo acetilado (Ac₂₋₂₆) é um agonista de FPR-2 e também ativa vias de modulação da resposta inflamatória. A região restante liga o domínio N-terminal à proteína do núcleo C-terminal (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; ZHARKOVA *et al.*, 2023). Porém, devido a seu tamanho o Ac₂₋₂₆ apresenta certa promiscuidade e se liga também ao receptor FPR-1 (ERNST *et al.*, 2004). No entanto, o Ac₂₋₂₆ se liga fracamente ao FPR-1 e gera uma resposta de baixa intensidade, devido sua principal via de sinalização ser por ligação ao receptor FPR-2 (DORWARD *et al.*, 2015; GAVINS *et al.*, 2012).

Ao ser secretada, a AnxA1 pode ser clivada pela elastase neutrofílica e pela proteinase 3 gerando uma isoforma de 33kDa e outros fragmentos peptídicos. Acredita-se que a clivagem de AnxA1 seja um mecanismo de inativação da proteína e pode estar associado a um perfil

inflamatório, porém ainda não foi elucidado se estes fragmentos possuem alguma função biológica específica (RESCHER *et al.*, 2006; VONG *et al.*, 2007, Sugimoto *et al.*, 2016).

Anexina A1 é uma proteína pró-resolutiva endógena, capaz de regular a inflamação sem bloquear a fase pró-inflamatória (DAMAZO *et al.*, 2011). Este conceito é muito importante no contexto das infecções bacterianas visto que a modulação de um processo inflamatório exacerbado é essencial para reestabelecer a homeostase e proteger o hospedeiro dos danos evocados pela infecção e, por outro lado, o bloqueio da resposta inflamatória pode favorecer a disseminação bacteriana. Sendo assim AnxA1 modula a resposta inflamatória por modular a transmigração de neutrófilos, promover o recrutamento de monócitos/macrófagos de forma não flogística e sua polarização para fenótipos anti-inflamatórios e pró-resolutivos, por induzir a apoptose de neutrófilos e sua subsequente remoção por eferocitose (PATEL *et al.*, 2011; SUGIMOTO *et al.*, 2016; YONA *et al.*, 2006). Esses eventos estão representados na Figura 6.

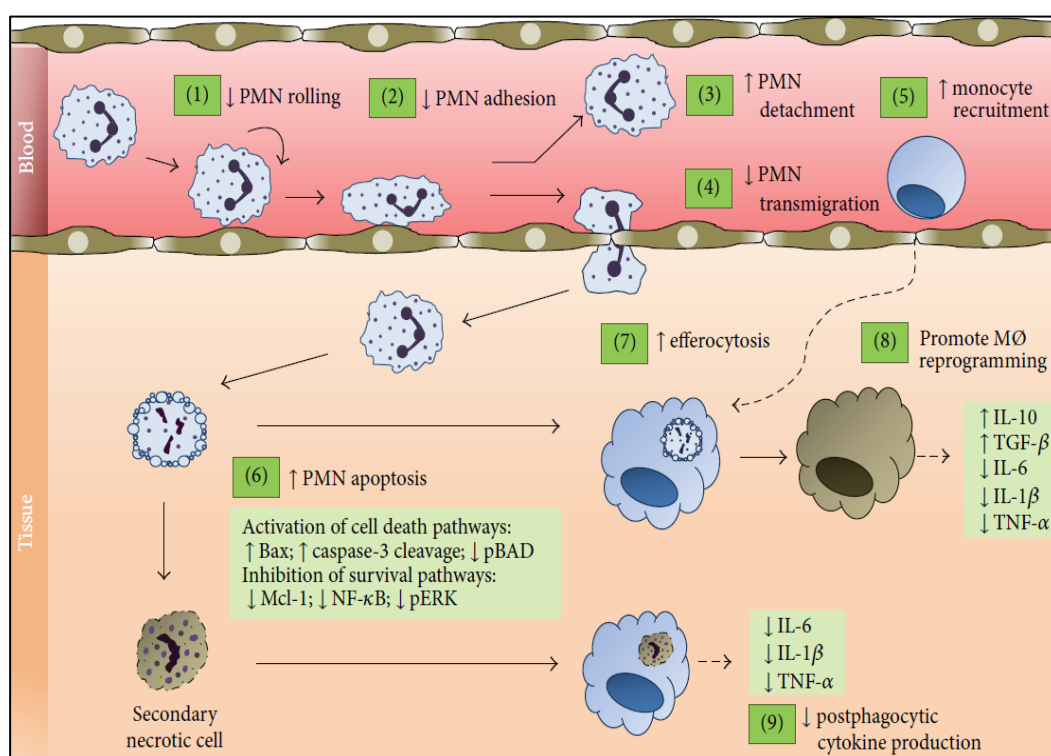


Figura 6: Eventos celulares associados aos efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos de AnxA1 e seus peptidomiméticos derivados da porção N-terminal. AnxA1 modula diversos eventos celulares e moleculares da resposta inflamatória, participando de mecanismos endógenos associados com a indução de uma resolução adequada. A administração farmacológica de AnxA1 resulta na diminuição do rolamento (1) e aderência (2) de neutrófilos ao endotélio, aumenta o desprendimento de células aderentes (3), e inibe a transmigração de neutrófilos (4). Além disso, AnxA1 é capaz de induzir apoptose (6). AnxA1 endógena e exógena também promove o recrutamento de monócitos (5) e a eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (7). A eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos é acompanhada pela indução de sinais anti-inflamatórios, incluindo produção de TGF-β e

reprogramação de macrófagos para um fenótipo pró-resolutivo (8), e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias após a eferocitose de células necróticas (9) (SUGIMOTO *et al.*, 2016).

Estudos mostraram que animais deficientes para AnxA1 apresentaram resposta exacerbada em modelos de endotoxemia induzida por LPS. E que a administração exógena de AnxA1 ou do peptidomimético Ac₂₋₂₆ induz ações anti-inflamatórias no modelo de lesão pulmonar induzida por LPS (DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a via pró-resolutiva ativada pela proteína AnxA1 controla a resposta inflamatória e a disseminação bacteriana na pneumonia experimental induzida por *Streptococcus pneumoniae* (MACHADO *et al.*, 2020). A modulação da resposta inflamatória é exercida principalmente pela capacidade da proteína em reduzir o infiltrado neutrofílico, sem alterar a capacidade dessas células exercerem suas funções efectoras. Outro importante estudo demonstrou que pacientes com dengue apresentaram níveis circulantes de AnxA1 reduzidos, e que a deleção gênica de AnxA1 ou FPR-2 agravou a doença em camundongos infectados com o vírus da dengue. Além disso, o tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ atenuou as manifestações da doença e atenuou os sintomas da doença (COSTA *et al.*, 2022). De forma interessante, um estudo de caso controle com 107 pacientes encontrou polimorfismos relacionados com a maior susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico para os genes de AnxA1, FPR-1 e FPR-2. Por outro lado, outros trabalhos descreveram o papel prejudicial de AnxA1 em modelos de infecção por Influenza vírus, câncer de laringe, câncer gastrointestinal e câncer de mama (ARORA *et al.*, 2016; GASTARDELO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2017; SATO *et al.*, 2011). Esses piores desfechos clínicos apresentados nestes estudos se devem ao fato de AnxA1 favorecer a replicação viral do Influenza A, além de contribuir para a proliferação celular e metástase, (ARORA *et al.*, 2016; FOO *et al.*, 2019). Considerando o papel dual de AnxA1 no contexto imunológico, o estudo da sua função frente a estímulos específicos é essencial.

2. JUSTIFICATIVA

A pneumonia adquirida no hospital (HAP), e a pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica (PAV), são infecções nosocomiais comuns, e que apresentam altos índices de mortalidade (TITOV *et al.*, 2021). As bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são os principais patógenos causadores de pneumonia hospitalar, e estão entre os mais significativos problemas de saúde mundial, devido à multirresistência aos antibióticos disponíveis na clínica (OLIVEIRA; REYGAERT, 2022). Uma resposta inflamatória exacerbada desencadeada pela infecção contribui para o dano pulmonar e gravidade da pneumonia (TAVARES *et al.*, 2022). Dados do nosso grupo de pesquisa e outros apontam que a modulação do processo inflamatório pode ser essencial para diminuir o dano associado à resposta inflamatória (MACHADO *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2022; TAVARES *et al.*, 2016). O estudo de moléculas pró-resolutivas é importante por oferecer uma oportunidade terapêutica única, uma vez que evitam os efeitos colaterais de outras estratégias imunomoduladoras e poderiam ser utilizadas em terapias combinadas com os antimicrobianos (PERRETTI; DALLI, 2023). A molécula pró-resolutiva AnxA1 mostrou capacidade de modular o processo inflamatório em diversos modelos de inflamação (SUGIMOTO *et al.*, 2016a). Porém os trabalhos que abordam o papel da AnxA1 em modelos infecciosos ainda são incipientes. Nesse contexto, a proposta do presente projeto é investigar o papel da via pró-resolutiva AnxA1/FPR2 em modelos pré-clínicos de pneumonia por bactérias Gram-negativas e avaliar o efeito terapêutico do peptidomimético da AnxA1, Ac₂₋₂₆, na fisiopatologia da infecção. Assim, o estudo desses fatores na pneumonia poderá proporcionar alternativas no controle do processo inflamatório, viabilizando o desenvolvimento de novos tratamentos.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Estudar o papel modulador da proteína pró-resolutiva AnxA1, e de seu receptor FPR2 em modelo murino de pneumonia induzida por *E. coli*. Posteriormente, avaliar o efeito terapêutico do peptidomimético da AnxA1, Ac₂₋₂₆, na fisiopatologia da infecção.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar o papel da proteína AnxA1 na infecção pulmonar por *E. coli*, utilizando camundongos deficientes para o gene da Anexina A1 (AnxA1 KO) e selvagens (WT) quanto aos:

- a. Parâmetros inflamatórios e carga bacteriana dos animais infectados;
- b. Dano tecidual causado pela infecção;
- c. Função pulmonar dos animais infectados.

3.2.2. Avaliar a contribuição do receptor FPR-2 na infecção pulmonar por *E. coli* utilizando camundongos deficientes para FPR-2/3 (FPR-2/3 KO) e selvagens (WT), quanto aos:

- a. Parâmetros inflamatórios e carga bacteriana dos animais infectados;
- b. Dano tecidual causado pela infecção.

3.2.3. Avaliar o papel do receptor FPR-2 na letalidade induzida pela infecção por *E. coli* utilizando camundongos FPR-2/3 KO e WT.

3.2.4. Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ em camundongos Balb/C WT infectados com *E. coli* quanto aos:

- a. Parâmetros inflamatórios e carga bacteriana;
- b. Dano tecidual.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos Balb/C WT e C57/Bl6 WT, machos de 8 a 10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, e mantidos pelo Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizados também, camundongos AnxA1 KO (*background* Balb/C), e camundongos FPR2/3 KO (*background* C57Bl/6), machos de 8 a 10 semanas, fornecidos e mantidos pelo Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas microisoladoras, dispostas em estantes para animais, com filtros de entrada e saída de ar, em condições de temperatura e luz controladas, com livre acesso à água e ração. Este estudo foi previamente submetido ao comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA: 262/2018) (Anexo1).

4.2. *Escherichia coli*

Para realização dos experimentos foi utilizada a cepa de *E.coli* ATCC 25922, conforme a padronização pelo nosso grupo de pesquisa (ZAIDAN *et al.*, 2022). Para preparação do inóculo, a linhagem previamente armazenada a -80°C foi semeada em meio de cultura ágar Mueller-Hinton e incubada a 37°C durante 14 horas. Em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica, a bactéria foi transferida para 15 ml de caldo de cultura LB, e incubada a 37°C até atingir a fase exponencial de crescimento, pela leitura de densidade óptica (OD) de 0.5 (600nm) em espectrofotômetro. Após a centrifugação e duas lavagens com 10ml de salina 0,9% estéril, o pellet de células foi ressuscitado em 1ml de solução salina, e a partir dessa suspensão de bactéria, o inóculo foi diluído em salina, e preparado de forma que o volume de 40 µl de solução continha 3×10^6 UFC/ml ou 5×10^6 UFC/ml de *E.coli*. Em todos os experimentos o inóculo foi confirmado por meio do plaqueamento da solução de bactéria em diferentes diluições, para contagem das colônias após 12 horas de incubação a 37°C.

4.3. Infecção dos camundongos

Os animais foram infectados por instilação via intranasal. Para isso, os animais foram anestesiados via subcutânea com uma solução contendo 80mg/kg de cetamina e 15mg/kg de xilazina. Após a anestesia os camundongos foram divididos em grupos a serem infectados com *E.coli*, ou aqueles que receberam solução salina, sendo considerados como grupo controle não infectado. Utilizando ponteiros estéreis, a solução contendo a bactéria foi gotejada lentamente nas narinas dos animais, de modo que eles aspirassem todo o volume correspondente ao inóculo. Todo o procedimento de infecção foi realizado no fluxo laminar e todos os animais foram monitorados até se recuperarem da sedação causada pelo anestésico.

4.4. Droga e esquema de tratamento

Para avaliação do efeito do peptídeo Ac₂₋₂₆ (sintetizado pela GenScript) durante a infecção com *Escherichia coli*, os camundongos foram tratados com 150µg do peptídeo, ou com veículo salina – salina estéril em 0,5% de DMSO – 200µl via intraperitoneal. Para avaliação dos parâmetros inflamatórios, os animais foram tratados 8 horas após a infecção e eutanasiados após 24 horas da infecção.

4.5. Acompanhamento da letalidade

Os animais foram pesados no tempo 0 antes da infecção, e após infectados, foram pesados e acompanhados durante 7 dias para a observação da letalidade. Os animais que atingiram perda superior que 25% do seu peso corporal inicial foram eutanasiados de acordo com a Resolução Normativa N° 33, de 18 de novembro de 2016 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.6. Eutanásia e coleta de amostras para análises

Para todos os experimentos os animais foram anestesiados com solução de 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina. Posteriormente, foram eutanasiados pelo método de exsanguinação, para coleta de sangue do plexo braquial, para posterior contagem de bactérias e dosagem de citocinas (RAUPP, 2013). Após a eutanásia, os animais foram submetidos à exposição da traqueia para a coleta do lavado broncoalveolar (BAL). O lavado consiste na introdução de uma cânula de 1,7 mm na traqueia do animal, a qual foi posteriormente conectada a uma seringa de 1 ml com PBS. Este volume foi recolhido e reintroduzido 3 vezes. Para obtenção de uma quantidade satisfatória de células, o lavado foi realizado duas vezes, totalizando 2 ml de PBS. O fluido do lavado broncoalveolar foi utilizado para contagem de

células, contagem de bactérias e dosagem de citocinas e proteínas. Após a realização do BAL, os animais tiveram seus pulmões perfundidos com uma seringa de 10 ml de PBS conectada a uma agulha de 21G. O ventrículo esquerdo foi cortado e os 10 ml de PBS foram injetados no ventrículo direito até o pulmão inflar e a solução de PBS sangue sair pelo ventrículo esquerdo. O lobo esquerdo foi coletado para histologia, e os lobos direitos processados para o ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO) e dosagens de citocinas.

4.6.1.1. Contagem de bactérias no lavado BAL

Após a realização BAL, 100 µl do fluido recuperado passou por diluições seriadas e logo foi plaqueado em placas de ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C durante 15 horas. Em seguida, as placas com a diluição contendo colônias em número entre 30 e 300 foram contadas e o resultado foi expresso em UFC por ml de BAL.

4.6.1.2. Contagem total e diferencial de células

O fluido recuperado do BAL foi submetido à centrifugação a 4°C a 300 g por 8 minutos. O sobrenadante foi recolhido e congelado, para posterior dosagem de proteínas totais por Bradford e citocinas por ELISA, enquanto o pellet foi ressuscitado em 100 µl de albumina bovina sérica (BSA) 3% em PBS. A alíquota das células em albumina foi diluída 10 vezes na solução de Turk (IMBRALAB), para a realização da contagem total de células, na câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, foram preparadas lâminas para citocentrifugação com as células ressuscitadas em albumina, de forma que as lâminas citocentrifugadas continham aproximadamente 40 mil células. As lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido (LB Laborclin), para a realização da contagem diferencial de células no aumento de 1000 vezes no microscópio óptico. As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos), e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), por meio de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

4.6.1.3. Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos pulmões pode ser correlacionado com a atividade da enzima MPO, a qual está presente em altos níveis em neutrófilos e, por isso é usada como indicador da presença dessas células (BARCELOS *et al.*, 2009)). Para isso, cinquenta miligramas do pulmão direito dos camundongos foram homogeneizados em 0,95 ml do Tampão 1 pH 4,7 (0,1 M de NaCl, 0,02 M de NaPO₄, 0,015 M de NaEDTA) utilizando para tanto, um

homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific Pennsylvania EUA). Após centrifugação por 10 minutos, a 4°C a 9400 g, o sobrenadante foi desprezado e o pellet submetido à lise de hemácias através da adição de 0,75 ml de NaCl 0,2%, seguida de 0,75ml de uma solução de NaCl 1,6% com glicose 5%. A solução final foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos, a 4°C a 9400 g. O sobrenadante então foi novamente desprezado e foram adicionados 0,8 ml de Tampão 2 (0,05 M de Na_3PO_4 e 0,5% de HETAB em pH 5,4) ao pellet, o qual foi novamente homogeneizado.

As amostras obtidas a partir do processamento descrito anteriormente foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, para liberação da enzima mieloperoxidase da vesícula citoplasmática. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 9400 g e o sobrenadante, diluído em Tampão 2 na proporção de 1:5, foi utilizado para o ensaio enzimático colorimétrico. Em uma placa contendo 96 poços foram adicionados 25 μl da amostra diluída e em seguida, 25 μl de tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) na concentração final de 1,6 nM. A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos e, após a adição de 100 μl de peróxido de hidrogênio 0,003% (diluído em Tampão 2 para MPO), uma nova incubação a 37°C por 5 minutos foi realizada. A reação leva ao aparecimento de uma cor azulada pela quebra do substrato TMB. Para o término desta reação, foram adicionados 100 μl de H_2SO_4 1M. A atividade da mieloperoxidase foi então proporcional à intensidade da cor observada em cada poço. A absorbância foi lida no espectrofotômetro no comprimento de onda 450nm.

4.6.1.4. Dosagem de proteína totais

A concentração de proteína total foi mensurada no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford, técnica que consiste em diluir a solução estoque 5x de Bradford da Biorad® para concentração de 1x. Foram pipetados 200 μl de Bradford 1x por poço, usando uma placa de 96 poços. Em seguida, 10 μl do sobrenadante do BAL em duplicata foi adicionado em cada poço contendo a solução de Bradford e homogeneizado. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda 595 nm, descontando a leitura do branco. Os resultados obtidos da absorbância foram comparados a uma curva padrão, feita com concentrações conhecidas de BSA.

4.6.1.5. Dosagem de citocinas por ELISA

O BALF, bem como o plasma dos animais foram utilizados para a dosagem de citocinas e quimiocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL1, CXCL2 e CCL2. O protocolo utilizado estava estabelecido no kit de ELISA murino da R&D Systems, em placas de 96 poços. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, adicionados à placa cobrindo os 96 poços e a placa foi armazenada à 4°C overnight. A placa foi lavada 3 vezes e, em seguida, foi realizado o bloqueio da reação com 1% de albumina bovina diluída em PBS por 2 horas à temperatura ambiente, para evitar a ligação inespecífica durante o ensaio. Após o bloqueio, a placa foi lavada e 50 μ l de amostra foram adicionados em cada poço e incubado overnight. No dia seguinte, após a lavagem, os anticorpos de detecção (diluídos em 0,1% de BSA/PBS) foram adicionados à placa e esta foi incubada por duas horas à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingen – 1:4000) e revelada com substrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma) com 0,006% peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M. A leitura foi feita no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices), com comprimento de onda de 492 nm. A cor obtida pela reação foi diretamente proporcional à concentração da citocina na amostra analisada. As absorbâncias obtidas pela leitura foram comparadas a uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina analisada, fornecidas no kit.

4.7. Análise da função pulmonar

A função pulmonar dos animais selvagens e deficientes para AnxA1 foi realizada pela análise de parâmetros espirométricos. Os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de cetamina e xilazina (15 mg/kg xilazina e 200mg/kg cetamina) para manutenção da respiração espontânea sob anestesia. Após a traqueostomia, os camundongos foram canulados e alocados em um pletismógrafo corporal com ventilação controlada, conectado a um computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, Wilmington, North Carolina – USA). O protocolo de medições foi iniciado com o respirador automático ligado em uma frequência respiratória de 160ms.

4.8. Avaliação de apoptose e eferocitose

A identificação e contagens de apoptose e macrófagos com corpos apoptóticos englobados foi realizada por microscopia óptica (objetiva 100x, 500 células/lâmina). Os resultados foram

expressos pela média $\pm$ SEM (erro padrão da média) da porcentagem de apoptose ou macrófagos com células apoptóticas em seu interior (VAGO et al., 2012; ZAIDAN et al., 2022).

4.9. Avaliação histológica

Após a eutanásia dos animais os pulmões esquerdos foram recolhidos e fixados em solução de formol 10% tamponado. As amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e fixadas em lâminas histológicas. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As análises das lâminas foram realizadas por patologista experiente, sem conhecimento prévio sobre os grupos experimentais, em microscópio óptico nas objetivas de 10 e 40 vezes, para determinação do padrão inflamatório. O grau de inflamação foi quantificado usando um escore semi-quantitativo da gravidade das alterações observadas. Os pontos foram distribuídos da seguinte forma: 0-5 para inflamação do parênquima e 0-5 para o infiltrado de polimormonuclear (0-ausente, 1-mínimo, 2-pouco, 3-moderado, 4-intenso, 5-muito intenso); 0-4 inflamação das vias aéreas e 0-4 inflamação vascular (0-ausência de células inflamatórias, 1-presença de poucas células inflamatórias, 2-presença de inflamação significativa e focalizada, 3-presença de inflamação disseminada, 4-inflamação significativa e disseminada). O total do escore histopatológico representa 18 pontos. Campos de imagens representativos de cada grupo foram capturados e fotografados no Microscópio Olympus Bx41 nas objetivas de 5 e 20x.

4.10. Análises estatísticas

Antes das análises estatísticas os conjuntos de dados foram submetidos à análise de distribuição de normalidade (Kolmogorov-Smirnov test). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) ou apenas como média. As médias foram comparadas utilizando análise de variância twoway ANOVA e oneway ANOVA. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM 6. A exclusão de valores outliers foi feita através do teste de Grubbs com nível de significância igual a 0.05. A curva de letalidade, construída no mesmo software, foi comparada utilizando o teste Log-rank qui-quadrado.

5. RESULTADOS

5.1 Anexina A1 é importante para o controle do recrutamento celular, promoção de apoptose/eferocitose e maior *clearence* bacteriano

Animais Balb/C WT e AnxA1 KO foram infectados com 3×10^6 UFC de *E. coli* e eutanasiados 24h após a infecção. O BAL foi coletado para análise do infiltrado celular, contagens de apoptose e eferocitose e carga bacteriana. De forma interessante, os animais AnxA1 KO apresentaram maior recrutamento de leucócitos (Figura 7A), principalmente neutrófilos (Figura 7B), nas vias aéreas quando comparados com os animais WT. De maneira interessante, foi observado um menor recrutamento de monócitos/macrófagos (Figura 7C) nos animais deficientes para AnxA1, bem como menores taxas de apoptose de neutrófilos e eferocitose dessas células por macrófagos (Figura 7 D-E). Apesar do maior recrutamento de neutrófilos, foram encontrados números significativamente maiores de bactérias nos pulmões de animais AnxA1 KO em comparação aos animais WT (Figuras 7 F-G).

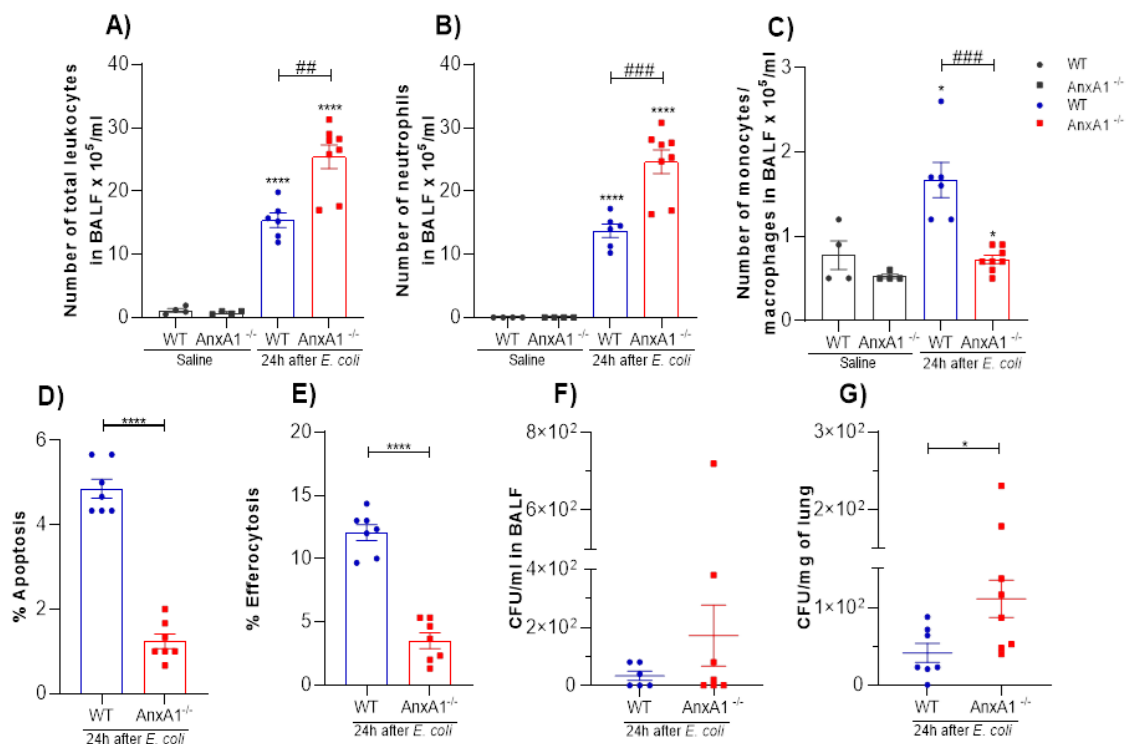


Figura 7: A deficiência gênica em AnxA1 intensifica a resposta inflamatória e prejudica o *clearence* bacteriano no pulmão. Camundongos Balb/C WT e AnxA1 KO foram infectados por via intranasal (i.n) com *E.coli* (3×10^6 UFC) e eutanasiados 24h após a infecção para contagens de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e monócitos/macrófagos (C) no BAL. Os gráficos (D-E) mostram a porcentagem de apoptose e eferocitose, respectivamente. Quantificação da carga bacteriana presente no BAL (F) e no pulmão (G). Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 animais grupo salina) e foram representados com * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

5.1.1 Anexina A1 é importante para o controle da produção de citocinas

Para compreender o maior recrutamento de leucócitos observado nos animais tanto Balb/C quanto nos AnxA1 KO, e para avaliar os parâmetros inflamatórios desencadeados pela pneumonia induzida por *E. coli*, foram realizadas dosagem das quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos (CXCL1 e CXCL2), e no recrutamento de monócitos/macrófagos (CCL2), além de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α). De forma interessante, os animais deficientes para AnxA1 apresentaram maiores níveis das quimiocinas CXCL1 (Figura 8A) e CXCL2 (Figura 8B) e das citocinas IL-1 β (Figura 8C) e TNF- α (Figura 8D). Os níveis de IL-6 (Figura 8E) não foram significativamente diferentes entre os animais WT e AnxA1 KO. Em contraste com o menor número de macrófagos observados no BAL (Figura 7C), maiores níveis da quimiocina CCL2 (Figura 8F), foram observados nos animais AnxA1 KO quando comparados com os animais WT.

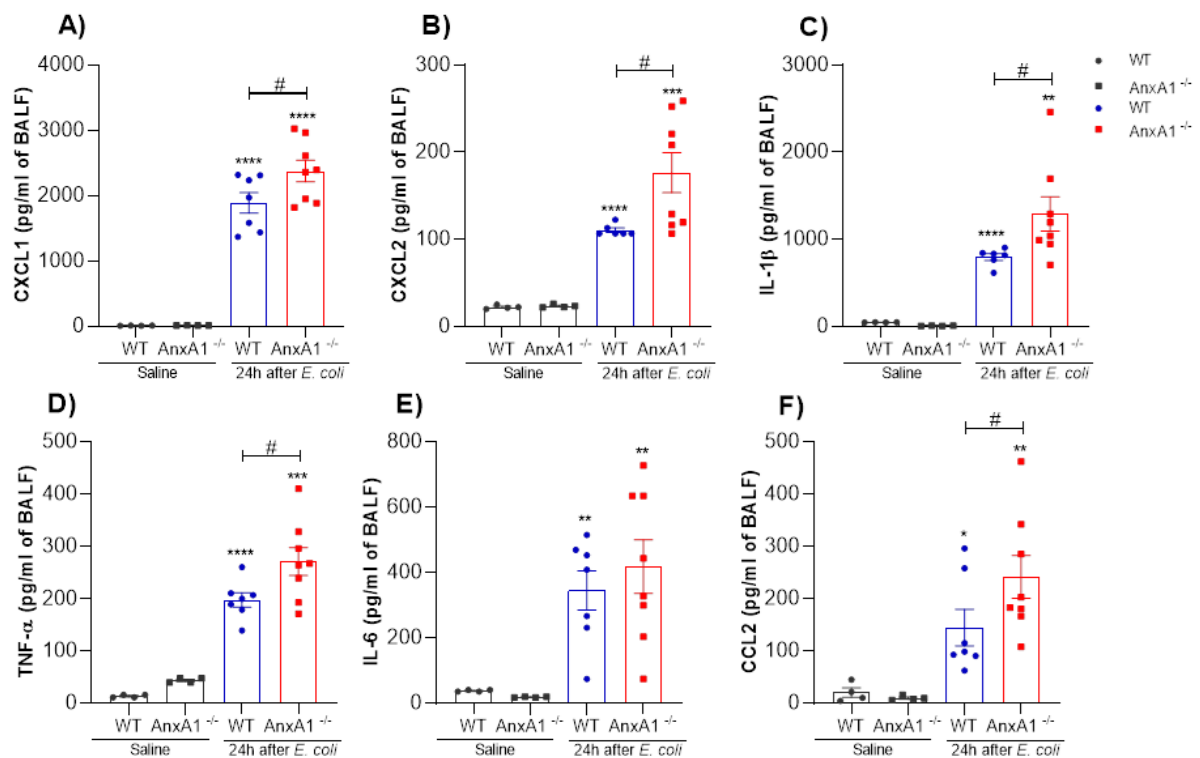


Figura 8: Mensuração de quimiocinas e citocinas em camundongos Balb/C WT e AnxA1 KO infectados com *E. coli*. Dosagem dos níveis de CXCL1 (A), CXCL2 (B), IL-1 β (C), TNF- α (D), IL-6 (E) e CCL2 (F) presentes no BALF. O grupo não infectado recebeu solução salina 0,9% por via intranasal. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 animais grupo salina) e foram representados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

5.1.2 Anexina A1 é importante para o controle do dano pulmonar durante a pneumonia induzida por *E. coli*

Visando analisar o dano pulmonar gerado nos animais AnxA1 KO pela exacerbação da resposta inflamatória após estímulo por *E. coli*, os níveis de proteína total foram quantificados como medida indireta de edema, além da quantificação de lactato desidrogenase (LDH) como medida indireta de lesão pulmonar. Complementar ao maior infiltrado neutrofílico observado no BAL dos animais deficientes para AnxA1, a atividade da enzima MPO foi mensurada no pulmão, como medida indireta da presença de neutrófilos no tecido. Animais AnxA1 KO infectados com *E. coli* apresentaram maiores níveis de proteínas totais (Figura 9A) e de LDH (Figura 9B) no BALF, e maior atividade de MPO (Figura 9C) no pulmão quando comparados aos animais WT infectados.

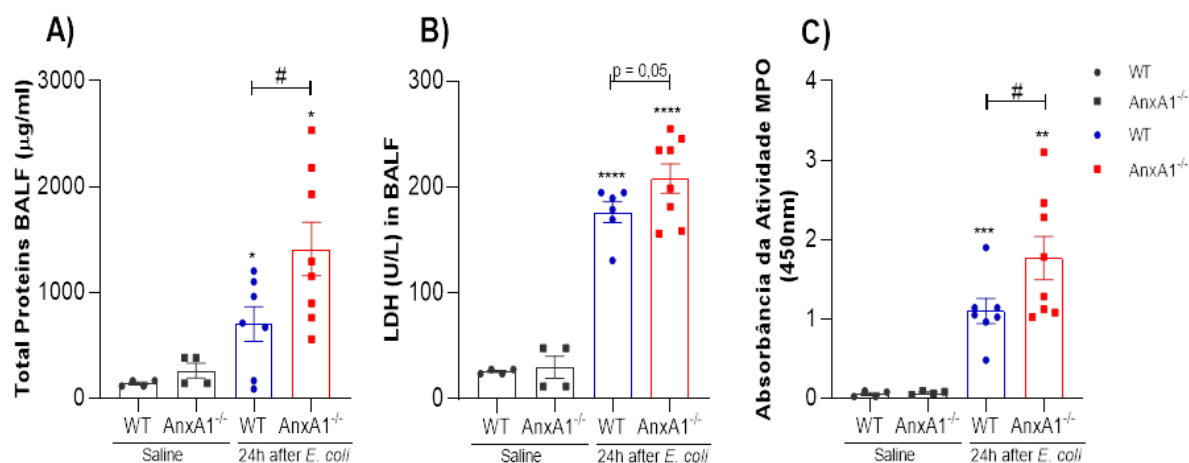


Figura 9: A deficiência gênica em AnxA1 aumenta parâmetros associados ao dano pulmonar promovido pela infecção por *E. coli*. Dosagem da quantidade total de proteínas no espaço alveolar (A); dos níveis de LDH (B) presentes no BALF. Amostras do lobo direito do pulmão foram submetidas à análise de atividade da enzima MPO (C). O grupo não infectado recebeu solução salina 0,9% por via intranasal. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 animais grupo salina) e foram representados com * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

Corroborando com as análises bioquímicas, a análise histopatológica dos pulmões 24h após a indução da pneumonia por *E. coli* mostrou que o grupo de animais deficientes em AnxA1 apresentou dano mais grave e maior infiltrado de células inflamatórias (Figura 10A e setas nas pranchas representativas).

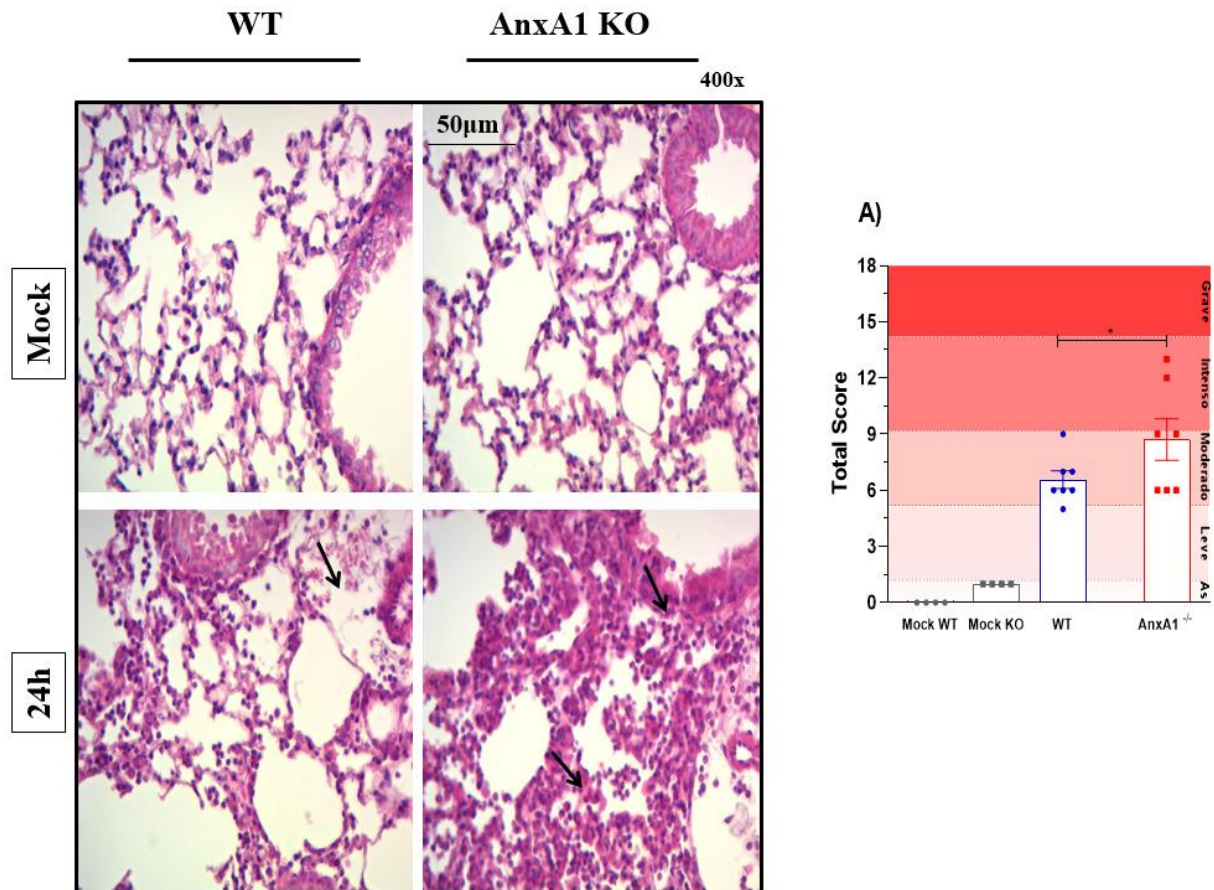


Figura 10: Análise do escore histopatológico dos pulmões de camundongos Balb/C WT e AnxA1 KO infectados com *E.coli*. Escore histológico do infiltrado inflamatório pulmonar (A). O grupo mock recebeu solução salina 0,9% por via intranasal. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 mock) por grupo e foram representados com * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 quando comparados com o grupo controle mock, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

Com o intuito de avaliar as alterações funcionais resultantes da inflamação exacerbada, a mecânica pulmonar foi avaliada e foram analisados os parâmetros de resistência pulmonar, complacência dinâmica e volume expiratório forçado em 50 milissegundos (FEV₅₀). Corroborando com as alterações histológicas, foi observado maior resistência pulmonar (Figura 11A), menor complacência dinâmica (Figura 11B) e menor volume de ar expirado (Figura 11C) nos animais deficientes para AnxA1, quando comparados com os animais WT.

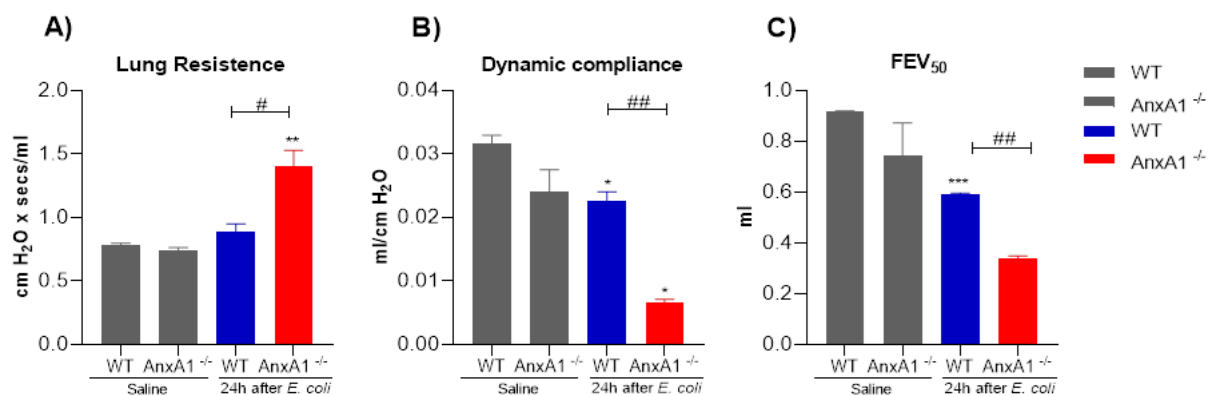


Figura 11: Avaliação da função pulmonar de camundongos Balb/C WT e AnxA1 KO 24h após a infecção por *E.coli*. Parâmetros como resistência pulmonar (A), complacência dinâmica (B) e volume forçado de ar expirado nos primeiros 50 ms (C) foram avaliados 24h após a infecção com *E.coli*. O grupo não infectado recebeu solução salina 0,9% por via intranasal. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 animais grupo salina) e foram representados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

Sabe-se que, a maioria das funções imunomodulatórias e pró-resolutivas sinalizadas por AnxA1 são dependentes da sua ligação ao receptor FPR-2 (PERRETI, et al., 2009). Para avaliar se a sinalização da proteína AnxA1 no modelo de pneumonia induzida por *E. coli* seria dependente do receptor FPR-2, animais FPR-2/3 KO foram infectados com *E. coli* e os parâmetros inflamatórios foram analisados. Em camundongos, o gene para expressão de FPR-2 e FPR-3 compartilham os dois primeiros éxons codificantes, portanto, para a deleção gênica de FPR-2 promoveu a deleção gênica subsequente de FPR-3. Sendo assim, os animais deficientes para FPR-2 são também deficientes para FPR-3 (GOBBETTI, et al., 2014). Visto que existem poucos estudos sobre o receptor FPR-3, que sua função não está bem estabelecida e que ele é fracamente ativado pelo seu único ligante (F2L), a deleção deste receptor parece não ter importância biológica para o modelo estudado (RABIET, et al., 2011).

5.2 O receptor FPR-2 é importante para o controle do recrutamento celular, maiores contagens de apoptose/eferocitose e maior *clearance* bacteriano

Animais C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO foram infectados com 3×10^6 UFC de *E. coli* e eutanasiados 24h após a infecção. O BAL foi coletado para análise do infiltrado celular, contagens de apoptose/eferocitose e carga bacteriana. De forma interessante, corroborando com os dados obtidos pela deficiência da proteína Anexina A1, os animais FPR-2/3 KO

apresentaram maior recrutamento de leucócitos (Figura 12A), principalmente neutrófilos (Figura 12B) nas vias aéreas, quando comparados com os animais WT. De maneira interessante, foi observado um menor recrutamento de monócitos/macrófagos (Figura 12C) nos animais deficientes para FPR-2/3, bem como menores taxas de apoptose de neutrófilos, e eferocitose dessas células por macrófagos (Figura 12 D-E). Apesar, do maior recrutamento de neutrófilos, foram encontrados números significativamente maiores de bactérias nas vias aéreas e pulmões de animais FPR-2/3 KO em comparação aos animais WT (Figuras 12 F-G).

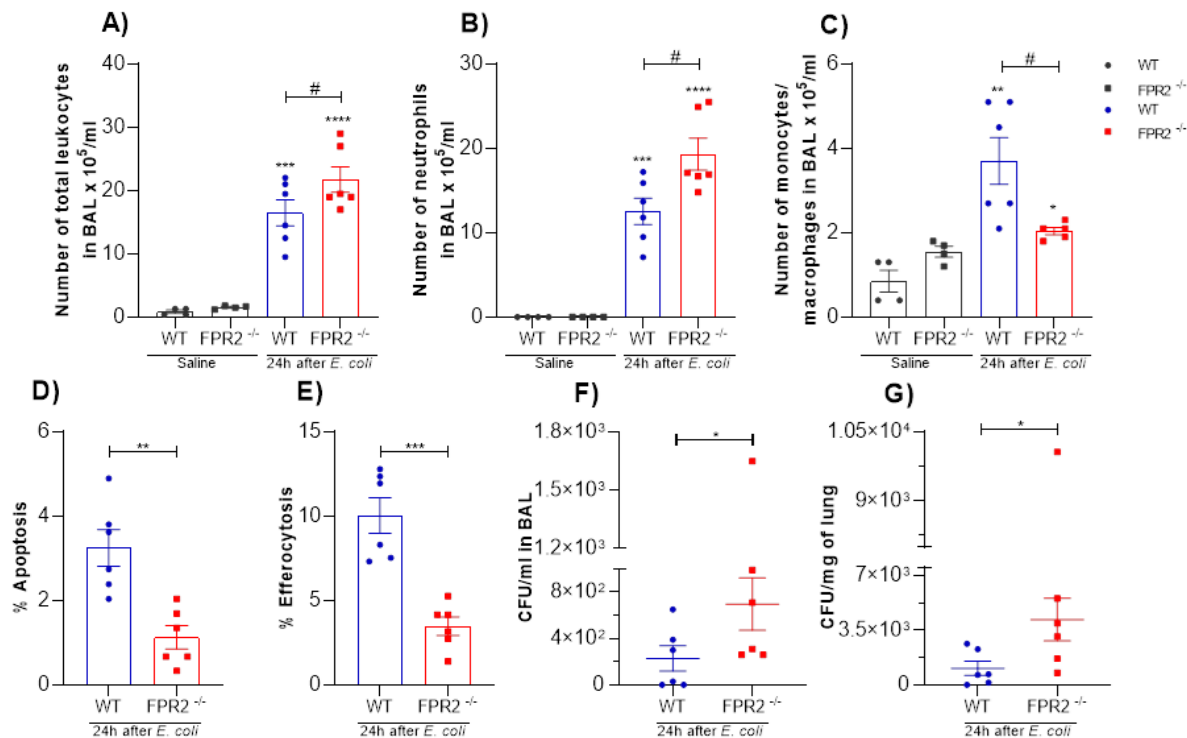


Figura 12: A deficiência gênica em FPR-2/3 intensifica a resposta inflamatória e prejudica o clearance bacteriano. Camundongos C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO foram infectados por via intranasal com *E. coli* (3x10⁶ UFC) e eutanasiados 24h após a infecção para contagens de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e monócitos/macrófagos (C) no BAL. Os gráficos (D-E) mostram a porcentagem de apoptose e eferocitose, respectivamente. Quantificação da carga bacteriana presente no BAL (F) e no pulmão (G). Os dados apresentam a média ± SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 animais grupo salina) e foram representados com * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

5.2.1 O receptor FPR-2 é importante para o controle da produção de citocinas

Para compreender o maior recrutamento de leucócitos observado nos animais tanto C57Bl/6 WT, quanto nos animais FPR-2/3 KO, foram dosadas as quimiocinas (CXCL1, CXCL2) envolvidas no recrutamento de neutrófilos, e a quimiocina (CCL2) envolvida no recrutamento de macrófagos, além da dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β e

TNF- α). De forma interessante, assim como para os animais deficientes em AnxA1, os animais deficientes para FPR-2/3 apresentaram maiores níveis das quimiocinas CXCL1 (Figura 13A), CXCL2 (Figura 13B), e das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 13C) e TNF- α (Figura 13D), os animais FPR-2/3 KO também apresentaram maiores níveis de CXCL1 pela dosagem da quimiocina no plasma. Os níveis da citocina IL-1 β (Figura 13E) não foram significativamente diferentes entre os animais WT e FPR-2/3 KO. Os animais deficientes para FPR-2/3 apresentaram maiores níveis da quimiocina CCL2 (Figura 13F) quando comparados com os animais WT.

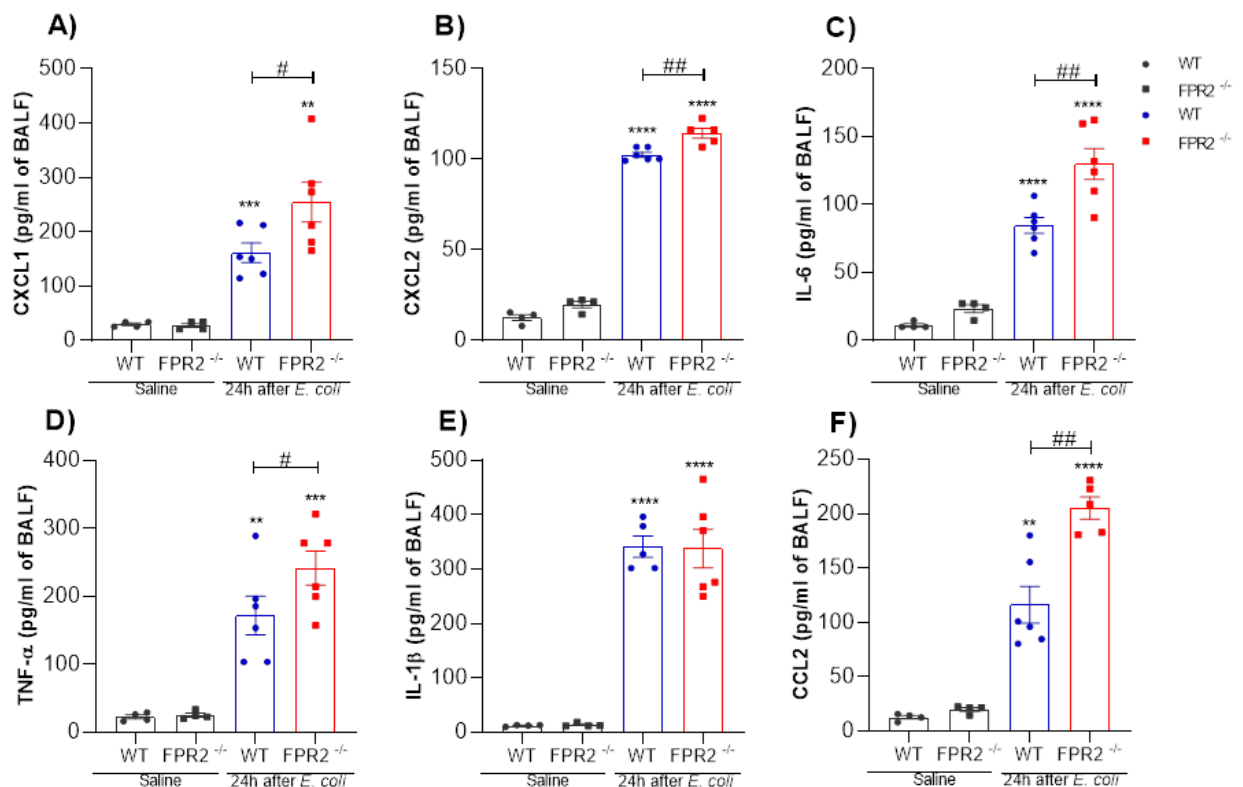


Figura 13: Mensuração de quimiocinas e citocinas no BAL de camundongos C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO 24h após a infecção por *E. coli*. Dosagem dos níveis de CXCL1 (A), CXCL2 (B), IL-6 (C), TNF- α (D), IL-1 β (E) e CCL2 (F) presentes no BALF. O grupo não infectado recebeu solução salina 0,9% por via intranasal. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 animais grupo salina) e foram representados com * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

5.2.2 O Receptor FPR-2 é importante para redução dos parâmetros associados ao dano pulmonar para a sobrevivência dos animais durante a pneumonia por *E. coli*

Considerando o maior recrutamento de leucócitos e maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias, foram analisados os parâmetros associados ao dano pulmonar. Os níveis de proteína total foram quantificados como medida indireta de edema, além da quantificação de LDH como medida indireta de lesão pulmonar. Complementar ao maior infiltrado neutrofílico nos animais deficientes para FPR-2/3, a atividade da enzima MPO foi mensurada no pulmão, como forma de contribuição para a lesão tecidual. Animais infectados apresentaram aumento de proteínas totais (Figura 14A) e de LDH (Figura 14B) no BALF, sendo os níveis ainda maiores nos animais FPR-2/3 KO. Além disso, animais FPR-2/3 KO apresentaram maior atividade de MPO (Figura 14C) no pulmão.

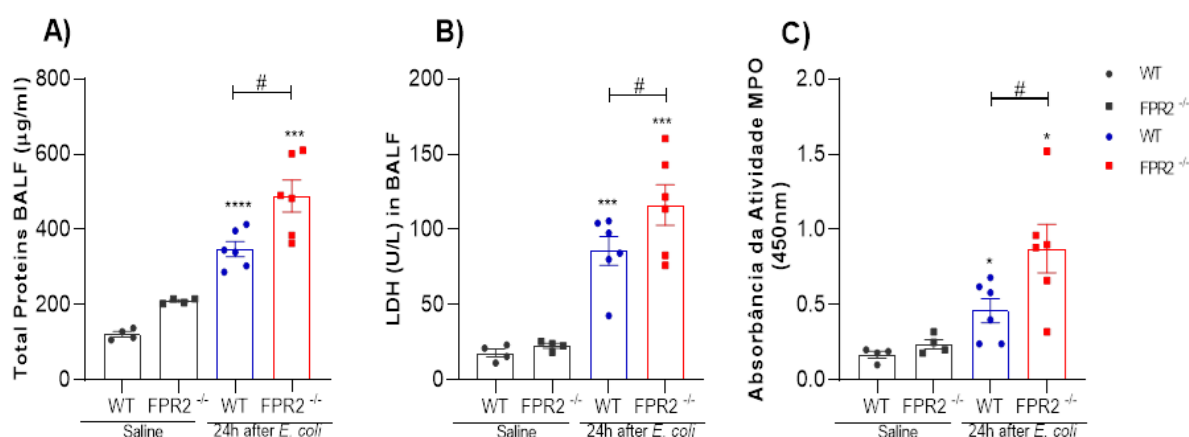


Figura 14: A deficiência gênica em FPR-2/3 aumenta parâmetros associados ao dano pulmonar promovido pela infecção por *E. coli*. Dosagem da quantidade total de proteínas no espaço alveolar (A); dos níveis de LDH (B) presentes no BALF. Amostras do lobo direito do pulmão foram submetidas à análise de atividade da enzima MPO (C). O grupo não infectado recebeu solução salina 0,9% por via intranasal. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 animais grupo salina) e foram representados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

Em adição, devido aos maiores níveis de proteína total no BALF em animais FPR-2/3 KO, foi então analisado o infiltrado inflamatório pulmonar e atribuído a ele pontuações (escore) de acordo com a intensidade e localização da lesão. A análise histopatológica dos pulmões 24h após a indução da pneumonia por *E. coli* mostrou que, embora os animais FPR-2/3 KO apresentem maior extravasamento de proteína total nas vias aéreas e maiores níveis de MPO (medida indireta do infiltrado neutrofílico no pulmão), não houve diferença significativa no escore de lesão pulmonar (Figura 15A) em comparação ao grupo WT.

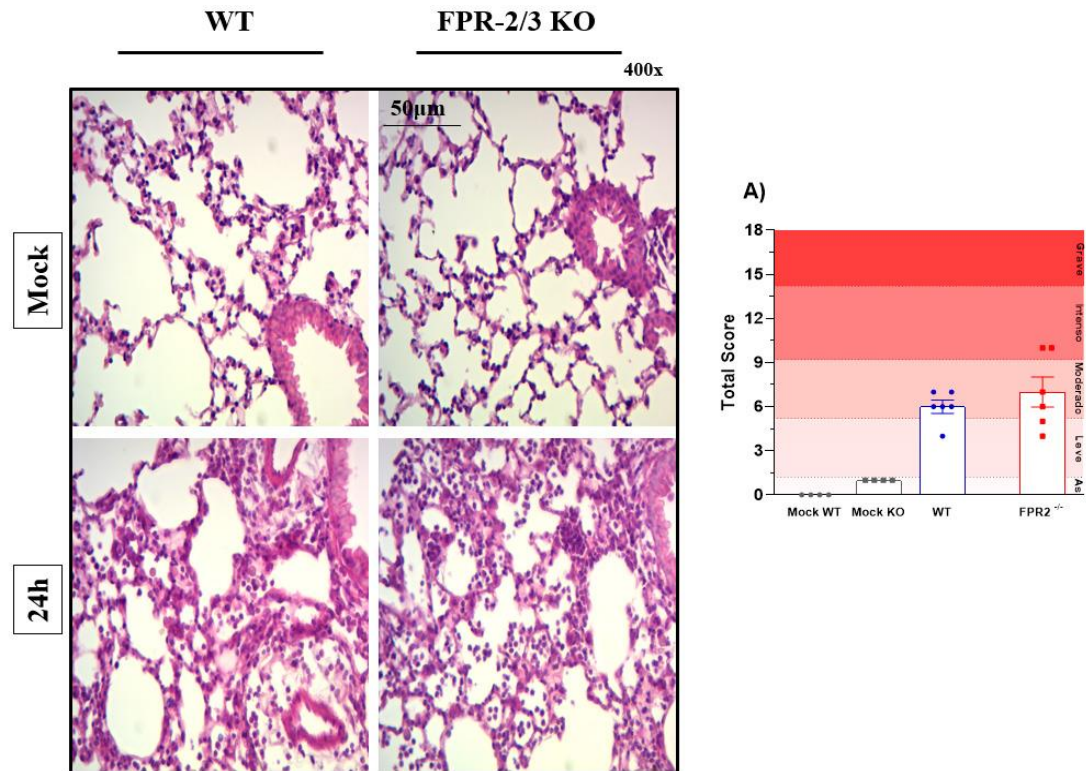


Figura 15: Análise do escore histopatológico do pulmão de camundongos C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO infectados com *E. coli*. Escore histológico do infiltrado inflamatório pulmonar. O grupo mock recebeu solução salina 0,9% por via intranasal. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 4 mock) por grupo e foram representados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle NI, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

Para avaliar a susceptibilidade dos animais FPR-2/3 KO frente à pneumonia por *E. coli*, animais C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO foram infectados com um inóculo letal de *E. coli* (5×10^6 UFC) e acompanhados durante 7 dias para letalidade. Os animais deficientes para FPR-2/3 apresentaram 72% de letalidade após infecção, enquanto 82% dos animais WT sobreviveram pós a infecção com *E. coli* (Figura 16).

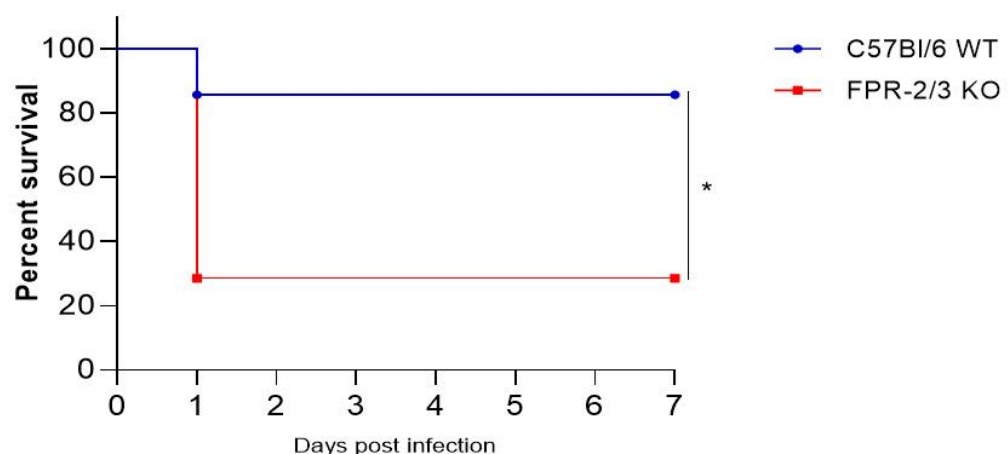


Figura 16: Curva de letalidade de camundongos C57Bl/6 WT e FPR-2/3 KO infectados com *E. coli* (5×10^6 UFC). Os camundongos foram infectados por via intranasal com *E. coli* (5×10^6 UFC), e acompanhados quanto à letalidade. Os dados são expressos em porcentagem de sobrevivência de 6 ou mais animais por grupo e a diferença foi representada com * para $p < 0,05$. A análise foi realizada pelo teste de Log-rank qui-quadrado.

5.3 Animais tratados com Ac₂₋₂₆ apresentaram redução no recrutamento celular, aumento nas contagens de apoptose/erocitose, e clearance bacteriano

Uma vez que a ausência de AnxA1 ou seu receptor levou a uma piora da inflamação, maior dano tecidual e aumentou a proliferação bacteriana nos pulmões de animais infectados por *E. coli*, o próximo passo foi verificar se a adição farmacológica de um peptidomimético de AnxA1 (Ac₂₋₂₆) impactaria na gravidade da infecção. Assim, para avaliar o impacto do tratamento com Ac₂₋₂₆ na pneumonia bacteriana experimental induzida por *E. coli*, os animais foram infectados com 3×10^6 UFC de *E. coli* e tratados 8h após a infecção com 150µg do peptídeo via intraperitoneal. Após 24h da infecção, o BAL foi coletado para análise do infiltrado celular, contagens de apoptose/erocitose e carga bacteriana. O grupo de animais infectados e tratados com veículo apresentou um aumento significativo no número de leucócitos totais, principalmente neutrófilos, por outro lado o tratamento com Ac₂₋₂₆ foi capaz de reduzir o infiltrado leucocitário (Figura 17A), e neutrofílico (Figura 17B). Os animais infectados e tratados com Ac₂₋₂₆ apresentaram aumento no número de monócitos/macrófagos (Figura 17C), maiores contagens de apoptose/erocitose (Figura 17 D-E) e redução da carga bacteriana nas vias aéreas e nos pulmões (Figura 17 F-G), quando comparados ao grupo veículo.

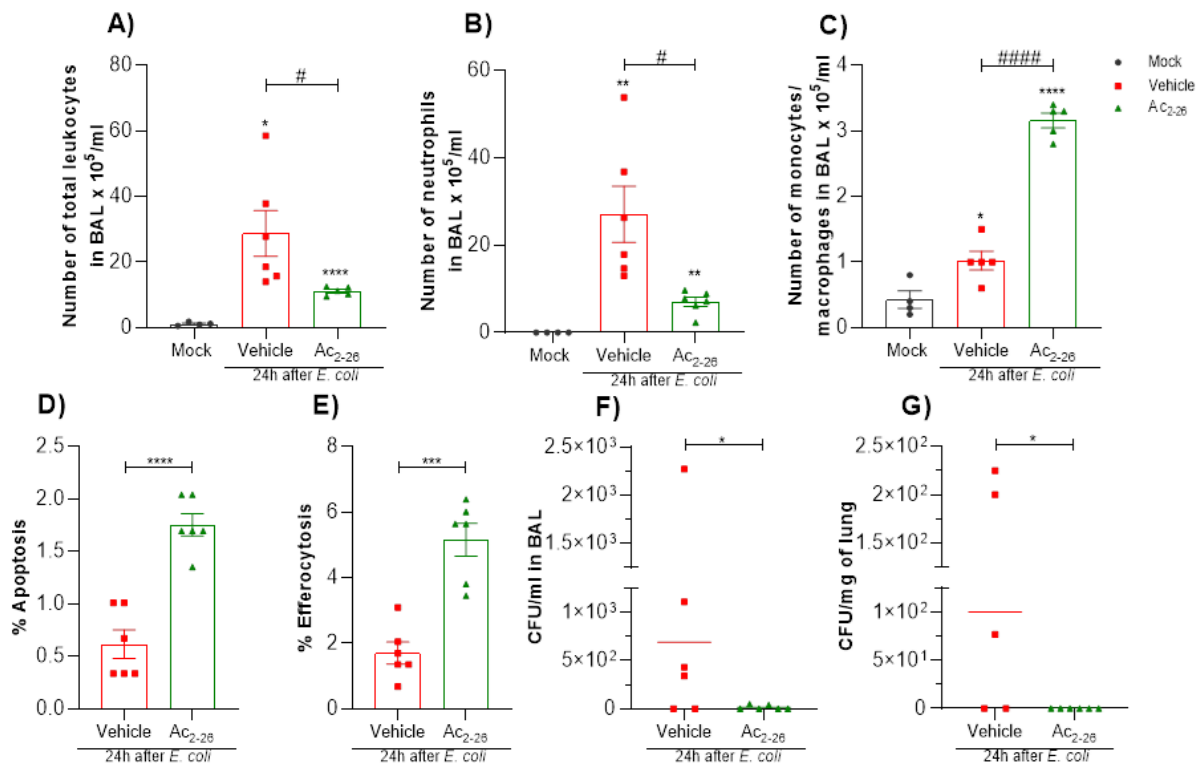


Figura 17: Efeito do tratamento com Ac₂₋₂₆ no curso da pneumonia induzida por *E. coli*. Camundongos Balb/C WT foram infectados por via intranasal com *E. coli* (3×10^6 UFC) e então tratados com Ac₂₋₂₆ (150 µg/camundongo, i.p.) 8h após a infecção. Os camundongos foram eutanasiados 24h após a infecção para contagens de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e monócitos/macrófagos (C) no BAL. Os gráficos (D-E) mostram a porcentagem de apoptose e eferocitose, respectivamente. Quantificação da carga bacteriana presente no BAL (F) e no pulmão (G). O grupo não infectado e o grupo veículo receberam solução salina 0,9% por via intranasal e intraperitoneal, respectivamente. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 3 animais grupo salina) e foram representados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

5.3.1 Animais tratados com Ac₂₋₂₆ apresentaram redução dos níveis de citocinas

Em seguida foi avaliado os níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias durante a infecção e após o tratamento com Ac₂₋₂₆. De forma interessante, corroborando com os dados obtidos de menor infiltração neutrofílica (Figura 17B), os animais tratados com Ac₂₋₂₆ apresentaram redução dos níveis da quimiocina CXCL1 (Figura 18A) envolvida no recrutamento neutrofílico, além de menores níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 18B), IL-1 β (Figura 18C), TNF- α (Figura 18D), quando comparados ao grupo tratado com veículo. Embora aumentados pós infecção, os níveis das quimiocinas CXCL2 (Figura 18E) e CCL2 (Figura 18F) não foram modificados após tratamento com Ac₂₋₂₆, permanecendo em níveis similares ao grupo tratado com veículo.

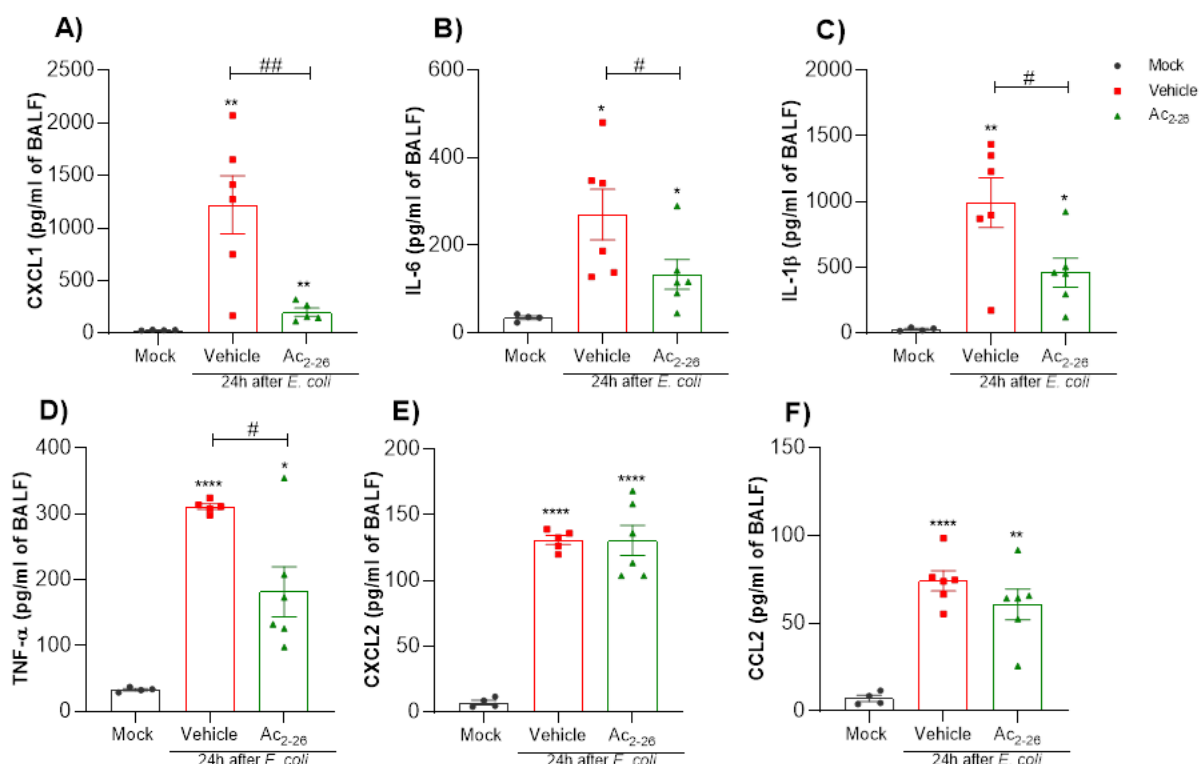


Figura 18: Efeito do tratamento com Ac₂₋₂₆ nos níveis de quimiocinas e citocinas induzidos durante a infecção com *E. coli*. Dosagem dos níveis de CXCL1 (A), IL-6 (B), IL-1β (C), TNF-α (D), CXCL2 (E) e CCL2 (F) presentes no BALF. O grupo não infectado e o grupo veículo receberam solução salina 0,9% por via intranasal e intraperitoneal, respectivamente. Os dados apresentam a média ± SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 3 animais grupo salina) e foram representados com * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

5.3.2 Animais tratados com Ac₂₋₂₆ apresentaram redução dos parâmetros associados ao dano pulmonar e controle do infiltrado inflamatório

Com intuito de avaliar os parâmetros associados ao dano pulmonar, os níveis de proteína total foram quantificados como medida indireta de edema, além da quantificação de LDH como medida indireta de lesão pulmonar. Complementar ao maior infiltrado neutrofílico, a atividade da enzima MPO foi mensurada no pulmão, como forma de contribuição para a lesão tecidual. Animais infectados e tratados com veículo apresentaram aumento de proteína total (Figura 19A) e de LDH (Figura 19B) no BALF, além de apresentarem maior atividade de MPO (Figura 19C) no pulmão, quando comparados ao grupo tratado com Ac₂₋₂₆.

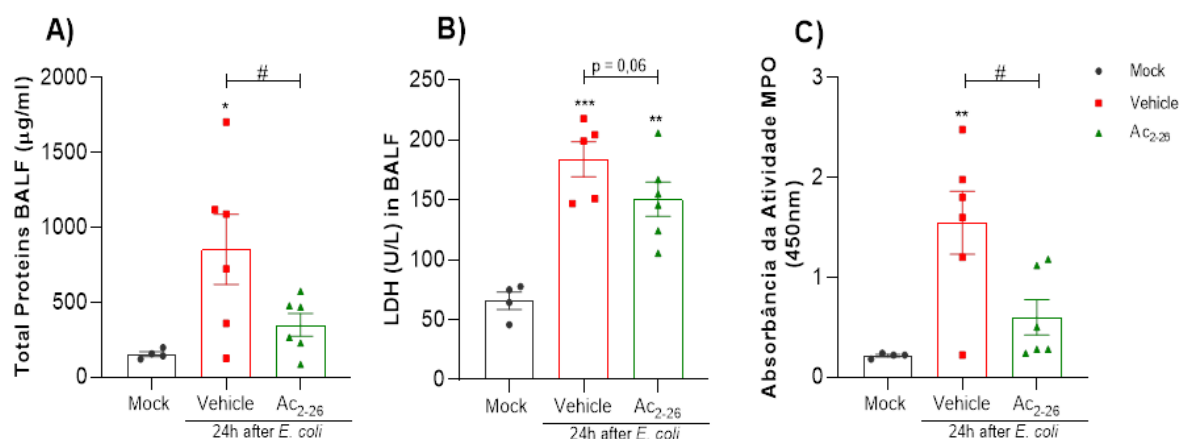


Figura 19: Efeito do tratamento com Ac_{2-26} no dano pulmonar associado à infecção por *E. coli*. Dosagem da quantidade total de proteínas no espaço alveolar (A); dos níveis de LDH (B) presentes no BALF. Amostras do lobo direito do pulmão foram submetidas à análise de atividade da enzima MPO (C). O grupo não infectado e o grupo veículo receberam solução salina 0,9% por via intranasal e intraperitoneal, respectivamente. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 3 animais grupo salina) e foram representados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle salina, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

Considerando o aumento de extravasamento de proteína total e parâmetros associados ao dano pulmonar, foi analisado o dano pulmonar resultante da infecção. Em acórdância com os dados anteriores, a análise histopatológica dos pulmões 24h após a indução da pneumonia induzida por *E. coli* mostrou que o tratamento com Ac_{2-26} foi capaz de atenuar o infiltrado inflamatório no pulmão e subsequente a lesão pulmonar (Figura 20A e setas nas pranchas representativas).

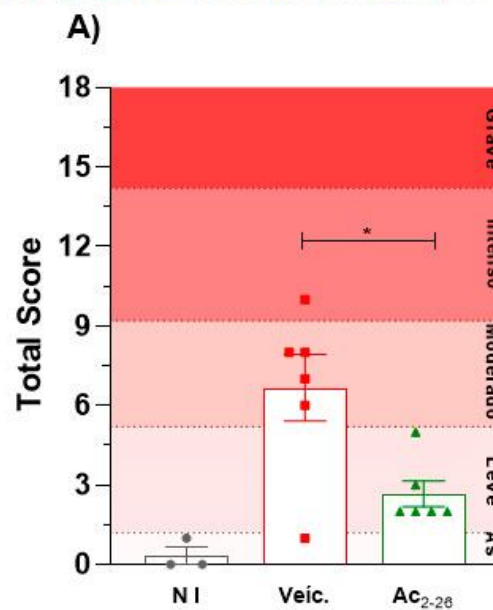
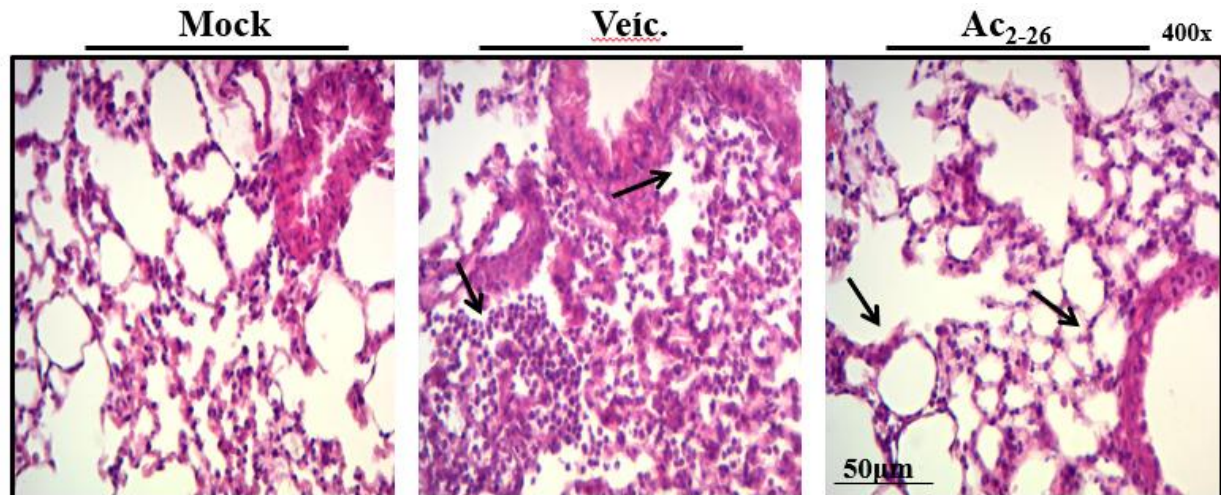


Figura 20: Análise do escore histopatológico do pulmão de camundongos Balb/C WT infectados com *E. coli* e tratados com Ac₂₋₂₆. Escore histológico do infiltrado inflamatório pulmonar. O grupo não infectado (NI) e o grupo veículo receberam solução salina 0,9% por via intranasal e intraperitoneal, respectivamente. Os dados apresentam a média $\pm$ SEM (N = 6-8 animais infectados e N = 3 NI) por grupo e foram representados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle NI, ou com o grupo indicado. As análises foram realizadas pelo teste t não pareado. Outliers detectados pelo teste de Grubbs foram excluídos das análises.

6. DISCUSSÃO

Pneumonia é uma infecção respiratória comum que afeta os alvéolos e a árvore brônquica distal dos pulmões, caracterizada pela inflamação do parênquima após o reconhecimento de microrganismos como fungos, vírus e bactérias. A resposta imune inata desencadeada frente ao estímulo infeccioso é essencial para proteção do hospedeiro. De fato, a resposta inflamatória é necessária para conter o microrganismo e fornecer estímulos coestimulatórios adequados para a resposta imune adaptativa (SOUSA; PINHO; TEIXEIRA, 2020; TORRES *et al.*, 2021).

A inflamação é um processo fisiológico e orquestrado principalmente por células e mediadores da imunidade inata. No entanto, a resposta inflamatória deve ser autolimitada e progredir para completa resolução da inflamação, com o propósito de eliminar o estímulo infeccioso (MEDZHITOV, 2010). A resolução da resposta inflamatória é um processo ativo que visa o retorno da homeostase tecidual, e envolve a produção de mediadores pró-resolutivos e/ou ativação de vias de sinalização. Por outro lado, a exacerbação da resposta inflamatória e ineficácia dos mecanismos do processo de resolução da inflamação podem causar intenso dano e disfunção pulmonar (QUINTON; WALKEY; MIZGERD, 2018; SUGIMOTO, Michelle A. *et al.*, 2016b).

A exacerbação da inflamação aguda no parênquima pulmonar após a infecção por bactérias Gram-negativos é caracterizada pelo rápido acúmulo de neutrófilos e ativação para liberação de proteases, sinalizados pelo aumento da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Esses fatores contribuem intensamente para lesões graves que pode culminar o pior desfecho clínico da pneumonia (TAVARES *et al.*, 2020). Neste contexto a ativação de vias pró-resolutivas desempenham potenciais alternativas terapêuticas como tratamentos adjuvantes para o controle de doenças infecciosas e inflamatórias graves (SOUSA; PINHO; TEIXEIRA, 2020; SUGIMOTO *et al.*, 2016b).

Os glicocorticoides são medicamentos importantes para o tratamento de muitas doenças inflamatórias, e frequentemente são utilizados como adjuvantes no tratamento de doenças infecciosas, incluindo meningite, tuberculose e pneumonia bacteriana (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2011). De fato, estudos pré-clínicos demonstram que a combinação de glicocorticoides com antibióticos previne danos pulmonares relacionados à inflamação durante a pneumonia, pela capacidade imunomodulatória desses fármacos. No entanto, o

tratamento com glicocorticoides por período prolongado ou em altas doses geralmente está associado a vários efeitos colaterais, além de induzirem a imunossupressão (GHONEIM; MCCULLERS, 2014; VANDEVYVER *et al.*, 2013).

Proteínas pró-resolutivas induzidas por glicocorticoides, como a AnxA1, podem ser importantes alternativas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que mimetizem as funções dos glicocorticoides sem apresentarem os potenciais efeitos colaterais, metabólicos e imunossupressores, estabelecidos por essa classe de fármacos (VAGO *et al.*, 2021). De maneira geral as ações atribuídas à proteína AnxA1 na modulação da resposta inflamatória se deve à sua ligação e ativação da via de sinalização do receptor FPR-2 (COORAY *et al.*, 2013). AnxA1 via FPR-2 pode desencadear efeitos anti-inflamatórios, tais como a inibição da produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios proteicos ou lipídicos. Em adição aos efeitos anti-inflamatórios, mais recentemente, ações pró-resolutivas da AnxA1 foram descritas incluindo estímulo à migração de monócitos, promoção de apoptose de neutrófilos e subsequente eferocitose, e a indução da polarização de macrófagos para fenótipos pró-resolutivos (LEONI *et al.*, 2015; SUGIMOTO, Michelle A. *et al.*, 2019). Assim como a proteína AnxA1, o peptidomimético correspondente a região N-terminal de AnxA1 também tem a capacidade de exercer funções pró-resolutivas, por semelhante interação com o receptor FPR-2 (COORAY *et al.*, 2013).

No presente trabalho, utilizamos um modelo experimental de pneumonia bacteriana induzido por *E. coli*, para compreender o papel do eixo AnxA1/FPR-2 na infecção pulmonar por Gram-negativo. Observamos que a ausência da proteína AnxA1 favorece a exacerbação da resposta inflamatória, pela proliferação e disseminação da bactéria, levando a um intenso dano tecidual e disfunção pulmonar. De maneira semelhante, a deleção gênica de FPR-2/3 também contribuiu para uma resposta inflamatória acentuada, desencadeada pelo menor *clearance* bacteriano e maior susceptibilidade a infecção por *E. coli*, estabelecidos pelos parâmetros associados ao dano pulmonar. Cabe ressaltar que FPR-2 também converge sinais de múltiplos agonistas do processo resolutivo e sua deleção gênica ter um impacto ainda maior frente a um estímulo inflamatório, quando comparado à deficiência de AnxA1 isoladamente. Porém, de maneira interessante, o tratamento com o peptidomimético Ac₂₋₂₆ foi capaz de atenuar a resposta inflamatória, reduzir a carga bacteriana, bem como promover a homeostase por diminuir o dano tecidual desencadeado pela exacerbação da resposta inflamatória durante a pneumonia induzida por *E. coli*.

O estudo da proteína AnxA1 endógena, no modelo de pneumonia bacteriana experimental mostrou resultados condizentes com aqueles obtidos na literatura referente a infecção pulmonar com bactéria Gram-negativo (MACHADO *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*, 2016). O maior infiltrado neutrofílico e maiores níveis de mediadores pró-inflamatórios é uma característica importante em modelos de pneumonia por bactérias Gram-negativos (KUMAR, 2020).

A análise do infiltrado leucocitário no espaço alveolar 24h após a infecção, mostrou que os animais AnxA1 KO e FPR-2/3 KO apresentaram maior número de leucócitos, principalmente neutrófilos, indicando que a deficiência do eixo pró-resolutivo AnxA1/FPR-2 leva a uma exacerbação da resposta inflamatória com maior dano pulmonar e maior letalidade dos animais frente a pneumonia induzida com *E. coli*. De fato, um maior infiltrado neutrofílico também foi observado na ausência de AnxA1 em modelos experimentais de doenças inflamatórias, como pleurisia e gota e até mesmo pneumonia pneumocócica. Animais deficientes em AnxA1 apresentaram um descontrole na produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para ativação e recrutamento exacerbado dessas células (GALVÃO *et al.*, 2017a; MACHADO *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*, 2016).

Em contrapartida, na ausência de AnxA1/FPR2-3 observamos uma falha no recrutamento de monócitos/macrófagos, bem como menores taxas de apoptose de neutrófilos e eferocitose dessas células por macrófagos. Os macrófagos são fundamentais para orquestrar a resolução da inflamação, exercendo funções efetoras como a fagocitose de bactérias e eferocitose de células apoptóticas, além da secreção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, como IL-10, TGF- β , INF- β (KUMARAN SATYANARAYANAN *et al.*, 2019). O *clearance* prejudicado de bactérias, mesmo na presença de maior número de neutrófilos, indica que estas células podem estar menos ativas ou com a capacidade reduzida para fagocitar e eliminar a bactéria. De fato, já foi demonstrado na literatura que os neutrófilos de animais FPR-2/3 KO exibem capacidade reduzida tanto para fagocitar, quanto para eliminar *E. coli* (GOBBETTI *et al.*, 2014). Os dados obtidos pelo déficit de apoptose e eferocitose na ausência da via pró-resolutiva AnxA1/FPR-2 evidenciam o papel da AnxA1 em promover apoptose, e o recrutamento de monócitos/macrófagos para a função de eferocitose, corroborando com dados descritos na literatura no modelo pleurisia induzida por LPS (VAGO *et al.*, 2012).

Após o reconhecimento da bactéria pelos PRRs de células epiteliais e células imunes, vias de sinalização são ativadas e culminam na produção e secreção de quimiocinas e citocinas

pró-inflamatórias. Os animais deficientes para o eixo AnxA1/FPR-2 apresentaram níveis elevados de CXCL1, CXCL2, TNF- α no BALF contribuindo para exacerbação da resposta inflamatória. Os níveis de TNF- α expressivamente maiores reforçam o papel do eixo pró-resolutivo para as funções homeostáticas por inibir o dano tecidual (OLMOS; LLADÓ, 2014; YAMAMOTO *et al.*, 2001).

De maneira interessante, os níveis da quimiocina CCL2 envolvida com o recrutamento de monócitos/macrófagos foram maiores nos animais AnxA1 KO e FPR-2/3 KO, mostrando a importância da via AnxA1/FPR-2 para as funções efectoras dessas células. O impacto da ausência de AnxA1 na função macrofágica também foi observado em outros estudos, nos quais macrófagos de animais AnxA1 KO apresentam menor expressão de receptores relacionados a fagocitose e redução na formação do fagolisossomo, essencial para a fagocitose (PATEL *et al.*, 2011; YONA *et al.*, 2006). Tal resultado difere do que já foi descrito na literatura, uma vez que CCL2 promove o recrutamento de monócitos/macrófagos. Este resultado supostamente está relacionado ao déficit da função fagocítica desses animais, no intuito de recuperar o recrutamento de monócitos/macrófagos, bem como suas funções efectoras reduzidas pela menor migração dessas células para o sítio inflamatório. Além disso, estudos mais detalhados foram realizados e mostraram que macrófagos de animais AnxA1 KO expressam menos receptores relacionados a fagocitose e tem mais dificuldade em remodelar o citoesqueleto para formar o “copo fagocítico” (PATEL *et al.*, 2011; YONA *et al.*, 2006).

O dano pulmonar decorrente da ativação excessiva do sistema imune foi avaliado de diferentes maneiras. Um método indireto de avaliar disfunção da permeabilidade da barreira epitelial pulmonar consiste em dosar a concentração de proteínas no BALF indicando edema. Maiores níveis de proteína total no BALF foram observados na ausência de AnxA1/FPR-2 indicando possível extravasamento de proteínas para o espaço alveolar. Outro método indireto para avaliar parâmetros associados à lesão pulmonar é a dosagem de LDH no BALF (MORIMOTO *et al.*, 2013). O LDH, ou lactato desidrogenase, é uma enzima citoplasmática que é liberada no meio extracelular quando há aumento de permeabilidade da membrana plasmática celular durante morte por necrose ou apoptose (NEWTON *et al.*, 2021). Os níveis de LDH foram maiores na deficiência de AnxA1/FPR-2 indicando morte no tecido pulmonar infectado. Coerente com os resultados obtidos, a análise histológica mostrou maior dano tecidual decorrente de resposta inflamatória acentuada em animais AnxA1 KO quando comparados aos animais WT. Este resultado está em consonância com a literatura, uma vez que diferentes trabalhos demonstram que animais deficientes para AnxA1 apresentam maior

infiltrado neutrofílico e maior dano tecidual em modelos experimentais de peritonite, aumento na deposição de colágeno em modelo de fibrose pulmonar e exacerbação do infiltrado de células inflamatórias e aumento de áreas necrosadas após infarto do miocárdio em camundongos (DAMAZO *et al.*, 2011; GASTARDELO *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2017).

Uma vez que a avaliação histológica revelou maior dano tecidual, a função pulmonar foi avaliada para estabelecer uma correlação entre a funcionalidade e o comprometimento tecidual. Em consonância com os dados histopatológicos, os animais deficientes para AnxA1 apresentaram maior resistência pulmonar, indicando obstrução das vias aéreas, provavelmente devido ao infiltrado fibrinoso e rico em células infiltradas durante a pneumonia. Essa obstrução impõe uma maior pressão pulmonar para que os animais expirem o mesmo fluxo de ar. Em adição, foi observado menor complacência dinâmica e menor FEV₅₀ nos animais AnxA1 KO, indicando dificuldade em distender o tecido e esvaziar os pulmões. Assim como no aumento da resistência, as reduções de complacência dinâmica e FEV₅₀ podem ter ocorrido também devido a produção excessiva de exsudato inflamatório, o qual pode ter obstruído os alvéolos e as vias aéreas. Esta hipótese é suportada pela literatura, em estudo que demonstra que a resposta inflamatória afeta diretamente a função pulmonar de camundongos com pneumonia (WRIGHT *et al.*, 1999). Além disso, animais com fibrose pulmonar apresentaram piora da mecânica pulmonar quando comparados aos animais WT (TRENTIN *et al.*, 2015).

Portanto, nossos dados suportam a conclusão que a ausência de AnxA1 e FPR-2/3 durante a pneumonia induzida por bactéria Gram-negativo, contribui para exacerbação da resposta inflamatória e disseminação bacteriana, o que resulta em maior dano pulmonar e desencadeamento da insuficiência respiratória. Depois de estabelecido o papel da AnxA1 e de seu receptor FPR-2 na resposta inflamatória desencadeada por *E. coli*, a associação dos resultados encontrados nos permite sugerir a participação de FPR-2 no papel exercido pela AnxA1. Tendo em vista que ambos os genótipos dos animais deficientes possuem *background* diferente (Balb/C e C57Bl/6), é importante ressaltar que esta comparação deve ser feita entre os animais de mesmo *background* e só então as diferenças podem ser confrontadas. Sendo assim, não é possível comparar valores absolutos encontrados em cada experimento. Mesmo com este viés de diferença no *background*, é possível comparar os resultados de maneira geral levando-se em conta os animais selvagens de cada grupo. Observamos que ambos os animais deficientes apresentaram maior susceptibilidade à infecção e em ambos os casos a resposta inflamatória foi exacerbada. Sendo esta resposta marcada por intenso infiltrado neutrofílico e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias no

BALF. Menor recrutamento de monócitos/macrófagos, evidenciando maior proliferação e disseminação bacteriana nestes animais, indicando que tanto a proteína AnxA1 quanto o receptor FPR-2 são importantes para o controle do recrutamento de leucócitos e suas funções efectoras. Sendo assim, podemos inferir que o papel da AnxA1 no processo inflamatório observado é dependente do receptor FPR-2.

Por outro lado, mesmo pelo fato de não podermos comparar os efeitos absolutos, devido às diferenças no *background* dos dois genótipos, devemos considerar que os animais deficientes para FPR-2/3 tendem a apresentar um fenótipo ainda mais inflamatório, quando comparados com animais deficientes para AnxA1, e este fato pode estar relacionado a outros mediadores pró-resolutivos, como Lipoxina A4 (LXA4), e Resolvina D1 (RvD1) que também utilizam o receptor FPR-2 para sinalização de vias pró-resolutivas (PERUCCI *et al.*, 2017).

De posse dos resultados obtidos até o momento, concluímos que a proteína AnxA1 não apenas modula a inflamação, como também contribui para a eliminação bacteriana via receptor FPR-2. Sendo assim, a avaliação do efeito terapêutico de um peptidomimético de AnxA1 agonista de FPR-2 passou a ser uma estratégia interessante, como alvo de estudo no modelo de pneumonia grave, induzida por bactérias Gram-negativos. O Ac₂₋₂₆, um peptídeo sintético da porção N-terminal de Anexina A1 e agonista de FPR-2 foi utilizado para tratar animais com pneumonia grave, induzida por *E. coli*, no intuito de avaliar se seria capaz de induzir uma melhora nos animais infectados. Os animais tratados com Ac₂₋₂₆ apresentaram redução do infiltrado leucocitário, principalmente neutrofílico, como também aumento no recrutamento de monócitos/macrófagos, quando comparados aos animais tratados com veículo. Este resultado corrobora com dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em modelos inflamatórios induzido por pneumonia pneumocócica, no qual o tratamento com Ac₂₋₂₆ reduziu o infiltrado inflamatório em animais infectados com *Streptococcus pneumoniae* (Gram-positivo) (MACHADO *et al.*, 2020). De forma interessante, o aumento no recrutamento de monócitos/macrófagos evidencia as maiores contagens de apoptose/eferocitose, e maior *clearance* bacteriano nos animais tratados com Ac₂₋₂₆. Estudos do nosso grupo de pesquisa utilizando modelos experimentais inflamatórios auto-resolutivos mostraram que alguns efeitos pró-resolutivos da Plasmina, um importante mediador do sistema fibrinolítico, são mediados por AnxA1, como a indução de apoptose e a eferocitose por macrófagos (SUGIMOTO, Michelle A. *et al.*, 2017). A eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos é um processo mediado principalmente por macrófagos do tipo M2 e é um

estágio crítico na resolução da inflamação. Macrófagos do tipo M2 produzem mediadores anti-inflamatórios como IL-10, INF- β e TGF- β (KUMARAN SATYANARAYANAN *et al.*, 2019; ZAIDAN *et al.*, 2022), e quantidades biologicamente ativas de mediadores pró-resolutivos lipídicos (SERHAN, 2014).

Ao avaliar as dosagens de citocinas no BALF, observamos que os níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias se correlacionaram com o maior infiltrado neutrofílico encontrado nos animais tratados com veículo. Os níveis de CXCL1, IL-6, IL-1 β e TNF- α foram expressivamente aumentados no grupo veículo, e reduzidos nos animais tratados com Ac₂₋₂₆. O tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ foi capaz de reduzir os níveis de CXCL1 e TNF- α refletindo no menor recrutamento neutrofílico no espaço alveolar. Esta redução de CXCL1 e TNF- α também foi observada em animais tratados com Ac₂₋₂₆ em um modelo de fibrose pulmonar (TRENTIN *et al.*, 2015). Embora os níveis de CXCL1 tenham sido reduzidos nos animais tratados com Ac₂₋₂₆, não observamos diferença significativa nos níveis de CXCL2 e CCL2 após o tratamento com o peptídeo quando comparados ao grupo veículo.

Para avaliar os parâmetros associados ao dano pulmonar foi dosada a concentração de proteínas totais e LDH no BALF e cortes histológicos dos pulmões foram analisados. Os animais tratados com veículo apresentaram alta concentração de proteínas totais, e uma tendência de aumento na concentração de LDH quando comparados aos animais tratados com Ac₂₋₂₆, indicando que o tratamento com o peptídeo foi capaz de reduzir o edema pulmonar. Este resultado é condizente com a literatura, pela qual é demonstrado que o tratamento com Ac₂₋₂₆ foi capaz de reduzir o edema pulmonar no modelo de isquemia e reperfusão pulmonar em camundongos. Porém, neste modelo o tratamento foi realizado antes da cirurgia e a eutanásia 3h após o tratamento (LIAO *et al.*, 2017). Coerente com os dados obtidos na avaliação dos parâmetros associados ao dano, o tratamento com Ac₂₋₂₆ foi eficaz em atenuar o infiltrado pulmonar representado pelo escore histológico.

Em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o tratamento com o Ac₂₋₂₆, peptidomimético de AnxA1, é capaz de reduzir a resposta inflamatória no modelo de pneumonia induzida por *E. coli*, consequentemente prevenindo os danos evocados pela infecção. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os achados já demonstrados pelo nosso grupo de pesquisa no modelo de pneumonia pneumocócica, na qual os parâmetros inflamatórios e a lesão pulmonar foram atenuados após o tratamento com Ac₂₋₂₆ (MACHADO *et al.*, 2020)

7. CONCLUSÃO

Diante os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o eixo pró-resolutivo AnxA1/FPR-2 exerce uma função crucial na modulação da resposta inflamatória, no *clearance* bacteriano, e prevenção da lesão pulmonar associada à pneumonia induzida por *E. coli*. Nesse sentido, o tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ mimetizando os efeitos moduladores de AnxA1 ao se ligar no receptor FPR-2, foi capaz de estabelecer o controle do processo inflamatório e promover melhora durante a pneumonia bacteriana experimental, induzida por uma bactéria Gram-negativo.

REFERÊNCIAS

- ALBIGER, B.; DAHLBERG, S.; SANDGREN, A.; WARTHA, F.; BEITER, K.; KATSURAGI, H.; AKIRA, S.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 633–644, mar. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00814.x>.
- ALMAND, E. A.; MOORE, M. D.; JAYKUS, L.-A. Virus-Bacteria Interactions: An Emerging Topic in Human Infection. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 58, 21 mar. 2017. <https://doi.org/10.3390/v9030058>.
- ANDRADE, D. C.; BORGES, I. C.; VILAS-BOAS, A. L.; FONTOURA, M. S. H.; ARAÚJO-NETO, C. A.; ANDRADE, S. C.; BRIM, R. V.; MEINKE, A.; BARRAL, A.; RUUSKANEN, O.; KÄYHTY, H.; NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. Infection by *Streptococcus pneumoniae* in children with or without radiologically confirmed pneumonia. **Jornal De Pediatria**, v. 94, n. 1, p. 23–30, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2017.03.004>.
- ARORA, S.; LIM, W.; BIST, P.; PERUMALSAMY, R.; LUKMAN, H. M.; LI, F.; WELKER, L. B.; YAN, B.; SETHI, G.; TAMBYAH, P. A.; FAIRHURST, A.-M.; ALONSO, S.; LIM, L. H. K. Influenza A virus enhances its propagation through the modulation of Annexin-A1 dependent endosomal trafficking and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1243–1256, jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.19>.
- AZEVEDO, J. V. V. de; SANTOS, C. A. C. dos; ALVES, T. L. B.; AZEVEDO, P. V. de; OLINDA, R. A. de. Influência do clima na incidência de infecção respiratória aguda em crianças nos municípios de campina grande e monteiro, paraíba, brasil. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 30, n. 4, p. 467–477, dez. 2015. DOI 10.1590/0102-778620140066. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-77862015000400467&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 21 fev. 2023.
- BARCELOS, L. S.; COELHO, A. M.; RUSSO, R. C.; GUABIRABA, R.; SOUZA, A. L. S.; BRUNO-LIMA, G.; PROUDFOOT, A. E. I.; ANDRADE, S. P.; TEIXEIRA, M. M. Role of the chemokines CCL3/MIP-1 alpha and CCL5/RANTES in sponge-induced inflammatory angiogenesis in mice. **Microvascular Research**, v. 78, n. 2, p. 148–154, set. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.04.009>.
- BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 1, p. 51–67, jan. 2016. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.4>.
- BASSETTI, M.; MULARONI, A.; GIACOBBE, D. R.; CASTALDO, N.; VENA, A. New Antibiotics for Hospital-Acquired Pneumonia and Ventilator-Associated Pneumonia. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 43, n. 02, p. 280–294, abr. 2022. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1740605>.
- BEAULIEU, E.; MORAND, E. F. Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 7, n. 6, p. 340–348, jun. 2011. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.59>.

BERTANI, B.; RUIZ, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, p. ecosalplus.ESP-0001-2018, 8 fev. 2018. DOI 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>. Acesso em: 20 fev. 2023.

CHEN, J.; PURVIS, G. S. D.; COLLOTTA, D.; AL ZOUBI, S.; SUGIMOTO, M. A.; CACACE, A.; MARTIN, L.; COLAS, R. A.; COLLINO, M.; DALLI, J.; THIEMERMANN, C. RvE1 Attenuates Polymicrobial Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction and Enhances Bacterial Clearance. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2080, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02080>.

CHENG, Q.; MORAND, E.; YANG, Y. H. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 169, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00169>.

CHIANG, N.; FREDMAN, G.; BÄCKHED, F.; OH, S. F.; VICKERY, T.; SCHMIDT, B. A.; SERHAN, C. N. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 524–528, 25 abr. 2012. <https://doi.org/10.1038/nature11042>.

COORAY, S. N.; GOBBETTI, T.; MONTERO-MELENDEZ, T.; MCARTHUR, S.; THOMPSON, D.; CLARK, A. J. L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 45, p. 18232–18237, 5 nov. 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308253110>.

COSTA, V. V.; SUGIMOTO, M. A.; HUBNER, J.; BONILHA, C. S.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; GONÇALVES-PEREIRA, M. H.; CHEN, J.; GOBBETTI, T.; LIBANIO RODRIGUES, G. O.; BAMBIRRA, J. L.; PASSOS, I. B.; MACHADO LOPES, C. E.; MOREIRA, T. P.; BONJOUR, K.; MELO, R. C. N.; OLIVEIRA, M. A. P.; ANDRADE, M. V. M.; SOUSA, L. P.; SOUZA, D. G.; ... TEIXEIRA, M. M. Targeting the Annexin A1-FPR2/ALX pathway for host-directed therapy in dengue disease. **eLife**, v. 11, p. e73853, 16 mar. 2022. <https://doi.org/10.7554/eLife.73853>.

DA CRUZ CAMPOS, A. C.; COUTO, N.; LUCAS DA SILVA ANDRADE, N.; FRIEDRICH, A. W.; DE PAULA ROSA, A. C.; VIEIRA DAMASCO, P.; CHLEBOWICZ-FLISS, M. A.; ROSSEN, J. W. A. Virulence and resistance properties of E. coli isolated from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil – The role of mobile genetic elements. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 310, n. 8, p. 151453, dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151453>.

DA CUNHA, E. E.; OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 303–311, ago. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.04.002>.

DAHBI, G.; MORA, A.; MAMANI, R.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P.; MARZOA, J.; BLANCO, M.; HERRERA, A.; VISO, S.; GARCÍA-GARROTE, F.; TCHESNOKOVA, V.; BILLIG, M.; DE LA CRUZ, F.; DE TORO, M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J.; PRATS, G.; CHAVES, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; LÓPEZ-CEREZO, L.; ... BLANCO, J. Molecular epidemiology and virulence of Escherichia coli O16:H5-ST131: Comparison with

H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1247–1257, nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.10.002>.

DAMAZO, A. S.; SAMPAIO, A. L.; NAKATA, C. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. **BMC Immunology**, v. 12, n. 1, p. 59, dez. 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-59>.

DENNING, N.-L.; AZIZ, M.; GURIEN, S. D.; WANG, P. DAMPs and NETs in Sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2536, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02536>.

DORWARD, D. A.; LUCAS, C. D.; CHAPMAN, G. B.; HASLETT, C.; DHALIWAL, K.; ROSSI, A. G. The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 5, p. 1172–1184, maio 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.020>.

DUFFIN, R.; LEITCH, A. E.; FOX, S.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies: Targeting granulocyte apoptosis. **Immunological Reviews**, v. 236, n. 1, p. 28–40, 15 jun. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00922.x>.

DURANTE-MANGONI, E.; ANDINI, R.; ZAMPINO, R. Management of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 8, p. 943–950, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.013>.

ERNST, S.; LANGE, C.; WILBERS, A.; GOEBELER, V.; GERKE, V.; RESCHER, U. An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 12, p. 7669–7676, 15 jun. 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7669>.

FILEP, J. G. Targeting Neutrophils for Promoting the Resolution of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 866747, 16 mar. 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.866747>.

FLOWER, R. J.; BLACKWELL, G. J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, v. 278, n. 5703, p. 456–459, 29 mar. 1979. <https://doi.org/10.1038/278456a0>.

FOO, S. L.; YAP, G.; CUI, J.; LIM, L. H. K. Annexin-A1 - A Blessing or a Curse in Cancer? **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 4, p. 315–327, abr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.02.004>.

FRITZENWANKER, M.; IMIRZALIOGLU, C.; HEROLD, S.; WAGENLEHNER, F. M.; ZIMMER, K.-P.; CHAKRABORTY, T. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections. **Deutsches Ärzteblatt international**, 21 maio 2018. DOI 10.3238/arztebl.2018.0345. Disponível em: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2018.0345>. Acesso em: 19 fev. 2023.

GALVÃO, I.; VAGO, J. P.; BARROSO, L. C.; TAVARES, L. P.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; COSTA, V. V.; CARNEIRO, F. S.; FERREIRA, T. P.; SILVA, P. M. R.; AMARAL, F. A.; SOUSA, L. P.; TEIXEIRA, M. M. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 3, p. 585–596,

mar. 2017. DOI 10.1002/eji.201646551. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201646551>. Acesso em: 20 fev. 2023.

GASTARDELO, T. S.; DAMAZO, A. S.; DALLI, J.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Functional and Ultrastructural Analysis of Annexin A1 and Its Receptor in Extravasating Neutrophils during Acute Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 177–183, jan. 2009. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080342>.

GAVINS, F. N. E.; HUGHES, E. L.; BUSS, N. A. P. S.; HOLLOWAY, P. M.; GETTING, S. J.; BUCKINGHAM, J. C. Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 12, p. 4977–4989, dez. 2012. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205971>.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, abr. 2013. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 331–371, abr. 2002. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001>.

GHONEIM, H. E.; MCCULLERS, J. A. Adjunctive Corticosteroid Therapy Improves Lung Immunopathology and Survival During Severe Secondary Pneumococcal Pneumonia in Mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 9, p. 1459–1468, 1 maio 2014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit653>.

GOBBETTI, T.; COLDEWEY, S. M.; CHEN, J.; MCARTHUR, S.; LE FAOUDER, P.; CENAC, N.; FLOWER, R. J.; THIEMERMANN, C.; PERRETTI, M. Nonredundant protective properties of FPR2/ALX in polymicrobial murine sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 52, p. 18685–18690, 30 dez. 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410938111>.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, maio 2015. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>.

HIRST, R. A.; KADIOGLU, A.; O'CALLAGHAN, C.; ANDREW, P. W. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 2, p. 195–201, nov. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02611.x>.

HOOGENDIJK, A. J.; ROELOFS, J. J. T. H.; DUITMAN, J.; VAN LIESHOUT, M. H. P.; BLOK, D. C.; VAN DER POLL, T.; WIELAND, C. W. R-roscovitine reduces lung inflammation induced by lipoteichoic acid and Streptococcus pneumoniae. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 18, n. 1, p. 1086–1095, 25 set. 2012. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00033>.

HORBY, PETER; HORBY, P.; LIM, W. S.; EMBERSON, J. R.; MAFHAM, M.; BELL, J. L.; LINSELL, L.; STAPLIN, N.; BRIGHTLING, C.; USTIANOWSKI, A.; ELMAHI, E.; PRUDON, B.; GREEN, C.; FELTON, T.; CHADWICK, D.; REGE, K.; FEGAN, C.; CHAPPELL, L. C.; FAUST, S. N.; ... LANDRAY, M. J. Dexamethasone in Hospitalized

Patients with Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693–704, 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>.

HUMMERS-PRADIER, E.; KOCH, M.; OHSE, A. M.; HEIZMANN, W. R.; KOCHEN, M. M. Antibiotic resistance of urinary pathogens in female general practice patients. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 256–261, 2005. .

IKEDA, Y.; MAMIYA, T.; NISHIYAMA, H.; KOSEKI, T.; MOURI, A.; NABESHIMA, T. RISK FACTORS FOR EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE- PRODUCING ESCHERICHIA COLI INFECTION IN HOSPITALIZED PATIENTS. [s. d.]. .

JIANG, K.; MA, X.; GUO, S.; ZHANG, T.; ZHAO, G.; WU, H.; WANG, X.; DENG, G. Anti-inflammatory Effects of Rosmarinic Acid in Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Mice. **Inflammation**, v. 41, n. 2, p. 437–448, 1 mar. 2018. DOI 10.1007/s10753-017-0700-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0700-8>. Acesso em: 22 fev. 2023.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, maio 2010. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.

KOPPE, U.; SUTTORP, N.; OPITZ, B. Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 460–466, abr. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x>.

KUMAR, V. Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1722, 4 ago. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01722>.

KUMARAN SATYANARAYANAN, S.; EL KEBIR, D.; SOBOH, S.; BUTENKO, S.; SEKHERI, M.; SAADI, J.; PELED, N.; ASSI, S.; OTHMAN, A.; SCHIF-ZUCK, S.; FEUERMAN, Y.; BARKAN, D.; SHER, N.; FILEP, J. G.; ARIEL, A. IFN- β is a macrophage-derived effector cytokine facilitating the resolution of bacterial inflammation. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3471, 2 ago. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10903-9>.

LA COMBE, B.; CLERMONT, O.; MESSIKA, J.; EVEILLARD, M.; KOUATCHET, A.; LASOCKI, S.; CORVEC, S.; LAKHAL, K.; BILLARD-POMARES, T.; FERNANDES, R.; ARMAND-LEFEVRE, L.; BOURDON, S.; REIGNIER, J.; FIHMAN, V.; DE PROST, N.; BADOR, J.; GORET, J.; WALLET, F.; DENAMUR, E.; ... COLOCOLI GROUP. Pneumonia-Specific Escherichia coli with Distinct Phylogenetic and Virulence Profiles, France, 2012-2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 710–718, abr. 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2504.180944>.

LEE, K. H.; KRONBICHLER, A.; PARK, D. D.-Y.; PARK, Y.; MOON, H.; KIM, H.; CHOI, J. H.; CHOI, Y.; SHIM, S.; LYU, I. S.; YUN, B. H.; HAN, Y.; LEE, D.; LEE, S. Y.; YOO, B. H.; LEE, K. H.; KIM, T. L.; KIM, H.; SHIM, J. S.; ... SHIN, J. I. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 11, p. 1160–1173, nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.09.012>.

LEE, W. Y.; PARKOS, C. A.; WINFREE, L. M.; AKYILDIZ, A.; PERRETTI, M.; NUSRAT, A. Annexin I Regulates SKCO-15 Cell Invasion by Signaling through Formyl

Peptide Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 28, p. 19588–19599, jul. 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513025200>.

LEONI, G.; NEUMANN, P.-A.; KAMALY, N.; QUIROS, M.; NISHIO, H.; JONES, H. R.; SUMAGIN, R.; HILGARTH, R. S.; ALAM, A.; FREDMAN, G.; ARGYRIS, I.; RIJCKEN, E.; KUSTERS, D.; REUTELINGSPERGER, C.; PERRETTI, M.; PARKOS, C. A.; FAROKHZAD, O. C.; NEISH, A. S.; NUSRAT, A. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 3, p. 1215–1227, 2 mar. 2015. <https://doi.org/10.1172/JCI76693>.

LI, C. C.; MUNITIC, I.; MITTELSTADT, P. R.; CASTRO, E.; ASHWELL, J. D. Suppression of Dendritic Cell-Derived IL-12 by Endogenous Glucocorticoids Is Protective in LPS-Induced Sepsis. **PLoS biology**, v. 13, n. 10, p. e1002269, out. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002269>.

LIAO, W.-I.; WU, S.-Y.; WU, G.-C.; PAO, H.-P.; TANG, S.-E.; HUANG, K.-L.; CHU, S.-J. Ac₂-26, an Annexin A1 Peptide, Attenuates Ischemia-Reperfusion-Induced Acute Lung Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1771, 15 ago. 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18081771>.

LUDDEN, C.; COLL, F.; GOULIOURIS, T.; RESTIF, O.; BLANE, B.; BLACKWELL, G. A.; KUMAR, N.; NAYDENOVA, P.; CRAWLEY, C.; BROWN, N. M.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J. Defining nosocomial transmission of Escherichia coli and antimicrobial resistance genes: a genomic surveillance study. **The Lancet. Microbe**, v. 2, n. 9, p. e472–e480, set. 2021. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00117-8).

LUGRIN, J.; MARTINON, F. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 99–114, jan. 2018. <https://doi.org/10.1111/imr.12618>.

MACHADO, M. G.; TAVARES, L. P.; SOUZA, G. V. S.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; ASCENÇÃO, F. R.; LOPES, M. E.; GARCIA, C. C.; MENEZES, G. B.; PERRETTI, M.; RUSSO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 2, p. 2749–2764, fev. 2020. <https://doi.org/10.1096/fj.201902172R>.

MACINTYRE, C. R.; CHUGHTAI, A. A.; BARNES, M.; RIDDA, I.; SEALE, H.; TOMS, R.; HEYWOOD, A. The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a(H1N1)pdm09. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 637, 7 dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3548-0>.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.

MELO, E. M.; DEL SARTO, J.; VAGO, J. P.; TAVARES, L. P.; RAGO, F.; GONÇALVES, A. P. F.; MACHADO, M. G.; ARANDA-PARDOS, I.; VALIATE, B. V. S.; CASSALI, G. D.; PINHO, V.; SOUSA, L. P.; A-GONZALEZ, N.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BADER, M.; SANTOS, R. A. S.; MACHADO, A. V.; LUDWIG, S.; TEIXEIRA, M. M. Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus

and post-influenza pneumococcal infection. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105292, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105292>.

MICHAELI, S.; DAKWAR, V.; WEIDENFELD, K.; GRANSKI, O.; GILON, O.; SCHIF-ZUCK, S.; MAMCHUR, A.; SHAMS, I.; BARKAN, D. Soluble Mediators Produced by Pro-Resolving Macrophages Inhibit Angiogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 768, 25 abr. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00768>.

MIZGERD, J. P. Inflammation and Pneumonia. **Clinics in Chest Medicine**, v. 39, n. 4, p. 669–676, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.07.002>.

MORAES, L. A.; KAR, S.; FOO, S. L.; GU, T.; TOH, Y. Q.; AMPOMAH, P. B.; SACHAPHIBULKIJ, K.; YAP, G.; ZHARKOVA, O.; LUKMAN, H. M.; FAIRHURST, A.-M.; KUMAR, A. P.; LIM, L. H. K. Annexin-A1 enhances breast cancer growth and migration by promoting alternative macrophage polarization in the tumour microenvironment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17925, 20 dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17622-5>.

MORALEDA, C.; SERNA-PASCUAL, M.; SORIANO-ARANDES, A.; SIMÓ, S.; EPALZA, C.; SANTOS, M.; GRASA, C.; RODRÍGUEZ, M.; SOTO, B.; GALLEGU, N.; RUIZ, Y.; URRETAVIZCAYA-MARTÍNEZ, M.; PAREJA, M.; SANZ-SANTAEUFEMIA, F. J.; FUMADÓ, V.; LANASPA, M.; JORDAN, I.; PRIETO, L.; BELDA, S.; ... EPICO-AEP WORKING GROUP. Multi-inflammatory Syndrome in Children Related to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Spain. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 72, n. 9, p. e397–e401, 4 maio 2021. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1042>.

MORIMOTO, Y.; HORIE, M.; KOBAYASHI, N.; SHINOHARA, N.; SHIMADA, M. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 770–781, 19 mar. 2013. <https://doi.org/10.1021/ar200311b>.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, dez. 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 6th ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2009.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 19 mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>.

NEWTON, D. A.; LOTTES, R. G.; RYAN, R. M.; SPYROPOULOS, D. D.; BAATZ, J. E. Dysfunctional lactate metabolism in human alveolar type II cells from idiopathic pulmonary fibrosis lung explant tissue. **Respiratory Research**, v. 22, n. 1, p. 278, 28 out. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01866-x>.

NICOLAS-CHANOINE, M.-H.; BERTRAND, X.; MADEC, J.-Y. Escherichia coli ST131, an Intriguing Clonal Group. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 543–574, jul. 2014. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of

Glucocorticoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3177–3184, fev. 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.179325>.

OLIVEIRA, J.; REYGAERT, W. C. Gram Negative Bacteria. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>. Acesso em: 19 fev. 2023.

OLMOS, G.; LLADÓ, J. Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–12, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/861231>.

PAPAZIAN, L.; KLOMPAS, M.; LUYT, C.-E. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 5, p. 888–906, maio 2020. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05980-0>.

PATEL, D. M.; AHMAD, S. F.; WEISS, D. G.; GERKE, V.; KUZNETSOV, S. A. Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 4, p. 578–588, 15 fev. 2011. <https://doi.org/10.1242/jcs.076208>.

PECHOUS, R. D. With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 160, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00160>.

PERCOPO, C. M.; DYER, K. D.; OCHKUR, S. I.; LUO, J. L.; FISCHER, E. R.; LEE, J. J.; LEE, N. A.; DOMACHOWSKIE, J. B.; ROSENBERG, H. F. Activated mouse eosinophils protect against lethal respiratory virus infection. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 743–752, 30 jan. 2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-502443>.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 62–70, jan. 2009. <https://doi.org/10.1038/nri2470>.

PERRETTI, M.; DALLI, J. Resolution Pharmacology: Focus on Pro-Resolving Annexin A1 and Lipid Mediators for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 63, p. 449–469, 20 jan. 2023. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051821-042743>.

PERUCCI, L. O.; SUGIMOTO, M. A.; GOMES, K. B.; DUSSE, L. M.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as a therapeutic strategy in human inflammatory diseases. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 9, p. 879–896, set. 2017. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1364363>.

QIN, C. X.; FINLAYSON, S. B.; AL-SHAREA, A.; TATE, M.; DE BLASIO, M. J.; DEO, M.; ROSLI, S.; PRAKOSO, D.; THOMAS, C. J.; KIRIAZIS, H.; GOULD, E.; YANG, Y. H.; MORAND, E. F.; PERRETTI, M.; MURPHY, A. J.; DU, X.-J.; GAO, X.-M.; RITCHIE, R. H. Endogenous Annexin-A1 Regulates Haematopoietic Stem Cell Mobilisation and Inflammatory Response Post Myocardial Infarction in Mice In Vivo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16615, 30 nov. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16317-1>.

QUINTON, L. J.; WALKEY, A. J.; MIZGERD, J. P. Integrative Physiology of Pneumonia. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1417–1464, 1 jul. 2018. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2017>.

RABIET, M.-J.; MACARI, L.; DAHLGREN, C.; BOULAY, F. N-Formyl Peptide Receptor 3 (FPR3) Departs from the Homologous FPR2/ALX Receptor with Regard to the Major Processes Governing Chemoattractant Receptor Regulation, Expression at the Cell Surface, and Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26718–26731, jul. 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244590>.

RESCHER, U.; GOEBELER, V.; WILBERS, A.; GERKE, V. Proteolytic cleavage of annexin 1 by human leukocyte elastase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 11, p. 1320–1324, nov. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.041>.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 380–390, maio 2014a. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 380–390, maio 2014b. DOI 10.1111/1469-0691.12646. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14600732>. Acesso em: 20 fev. 2023.

SAMARASINGHE, A. E.; MELO, R. C. N.; DUAN, S.; LEMESSURIER, K. S.; LIEDMANN, S.; SURMAN, S. L.; LEE, J. J.; HURWITZ, J. L.; THOMAS, P. G.; MCCULLERS, J. A. Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 198, n. 8, p. 3214–3226, 15 abr. 2017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600787>.

SATO, Y.; KUMAMOTO, K.; SAITO, K.; OKAYAMA, H.; HAYASE, S.; KOFUNATO, Y.; MIYAMOTO, K.; NAKAMURA, I.; OHKI, S.; KOYAMA, Y.; TAKENOSHITA, S. Up-regulated Annexin A1 expression in gastrointestinal cancer is associated with cancer invasion and lymph node metastasis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 2, p. 239–243, mar. 2011. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.210>.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. **Journal of Intensive Care**, v. 8, n. 1, p. 13, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>.

SENDER, V.; HENTRICH, K.; HENRIQUES-NORMARK, B. Virus-Induced Changes of the Respiratory Tract Environment Promote Secondary Infections With *Streptococcus pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 643326, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.643326>.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 5 jun. 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13479>.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, dez. 2005. <https://doi.org/10.1038/ni1276>.

SHORT, K. R.; HABETS, M. N.; HERMANS, P. W. M.; DIAVATOPOULOS, D. A. Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship? **Future Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 609–624, maio 2012. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.29>.

SOUSA, Lirlândia P.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Harnessing inflammation resolving-based therapeutic agents to treat pulmonary viral infections: What can the future offer to COVID-19? **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 17, p. 3898–3904, set. 2020. <https://doi.org/10.1111/bph.15164>.

SOUSA, Lirlândia Pires; ALESSANDRI, A. L.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 625–631, ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.007>.

SOUZA, J. A. M.; CARVALHO, A. F. S.; GROSSI, L. C.; ZAIDAN, I.; DE OLIVEIRA, L. C.; VAGO, J. P.; CARDOSO, C.; MACHADO, M. G.; SOUZA, G. V. S.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MORAND, E. F.; BRUSCOLI, S.; RICCARDI, C.; TEIXEIRA, M. M.; TAVARES, L. P.; SOUSA, L. P. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Alleviates Lung Inflammation and Enhances Bacterial Clearance during Pneumococcal Pneumonia. **Cells**, v. 11, n. 3, p. 532, 3 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11030532>.

SPITE, M.; NORLING, L. V.; SUMMERS, L.; YANG, R.; COOPER, D.; PETASIS, N. A.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SERHAN, C. N. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1287–1291, 29 out. 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08541>.

SUGIMOTO, Michelle A.; RIBEIRO, A. L. C.; COSTA, B. R. C.; VAGO, J. P.; LIMA, K. M.; CARNEIRO, F. S.; ORTIZ, M. M. O.; LIMA, G. L. N.; CARMO, A. A. F.; ROCHA, R. M.; PEREZ, D. A.; REIS, A. C.; PINHO, V.; MILES, L. A.; GARCIA, C. C.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. **Blood**, v. 129, n. 21, p. 2896–2907, 25 maio 2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742825>.

SUGIMOTO, Michelle A.; SOUSA, L. P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? **Frontiers in Immunology**, v. 7, 26 abr. 2016a. DOI 10.3389/fimmu.2016.00160. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00160/abstract>. Acesso em: 19 fev. 2023.

SUGIMOTO, Michelle A.; SOUSA, L. P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? **Frontiers in Immunology**, v. 7, 26 abr. 2016b. DOI 10.3389/fimmu.2016.00160. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00160/abstract>. Acesso em: 19 fev. 2023.

SUGIMOTO, Michelle A.; VAGO, J. P.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 212–227, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.007>.

SUGIMOTO, Michelle Amantéa; VAGO, J. P.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 8239258, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8239258>.

SYED, Y. Y. Cefiderocol: A Review in Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v. 81, n. 13, p. 1559–1571, set. 2021. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01580-4>.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.

TAVARES, Luciana P.; GARCIA, C. C.; VAGO, J. P.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; GALVÃO, I.; DAVID, B. A.; RACHID, M. A.; SILVA, P. M. R.; RUSSO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Inhibition of Phosphodiesterase-4 during Pneumococcal Pneumonia Reduces Inflammation and Lung Injury in Mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, n. 1, p. 24–34, jul. 2016. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0083OC>.

TAVARES, Luciana P.; PEH, H. Y.; TAN, W. S. D.; PAHIMA, H.; MAFFIA, P.; TILIGADA, E.; LEVI-SCHAFFER, F. Granulocyte-targeted therapies for airway diseases. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104881, jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104881>.

TAVARES, Luciana Pádua; GALVÃO, I.; FERRERO, M. R. Novel Immunomodulatory Therapies for Respiratory Pathologies. **Comprehensive Pharmacology**. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 554–594. DOI 10.1016/B978-0-12-820472-6.00073-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128204726000736>. Acesso em: 19 fev. 2023.

TAVARES, Luciana Pádua; MELO, E. M.; SOUSA, L. P.; TEIXEIRA, M. M. Pro-resolving therapies as potential adjunct treatment for infectious diseases: Evidence from studies with annexin A1 and angiotensin-(1-7). **Seminars in Immunology**, v. 59, p. 101601, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2022.101601>.

TETRO, J. A. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? **Microbes and Infection**, v. 22, n. 2, p. 72–73, mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.02.006>.

TITOV, I.; WUNDERINK, R. G.; ROQUILLY, A.; RODRÍGUEZ GONZALEZ, D.; DAVID-WANG, A.; BOUCHER, H. W.; KAYE, K. S.; LOSADA, M. C.; DU, J.; TIPPING, R.; RIZK, M. L.; PATEL, M.; BROWN, M. L.; YOUNG, K.; KARTSONIS, N. A.; BUTTERTON, J. R.; PASCHKE, A.; CHEN, L. F. A Randomized, Double-blind, Multicenter Trial Comparing Efficacy and Safety of Imipenem/Cilastatin/Relebactam Versus Piperacillin/Tazobactam in Adults With Hospital-acquired or Ventilator-associated Bacterial Pneumonia (RESTORE-IMI 2 Study). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 73, n. 11, p. e4539–e4548, 6 dez. 2021. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa803>.

TOMLINSON, G.; CHIMALAPATI, S.; POLLARD, T.; LAPP, T.; COHEN, J.; CAMBERLEIN, E.; STAFFORD, S.; PERISELNERIS, J.; ALDRIDGE, C.; VOLLMER, W.; PICARD, C.; CASANOVA, J.-L.; NOURSADEGHI, M.; BROWN, J. TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface

expression of bacterial lipoproteins. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 193, n. 7, p. 3736–3745, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401413>.

TORRES, A.; CILLONIZ, C.; NIEDERMAN, M. S.; MENÉNDEZ, R.; CHALMERS, J. D.; WUNDERINK, R. G.; VAN DER POLL, T. Pneumonia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 25, 8 abr. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00259-0>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. Twelfth edition. Boston: Pearson, 2016.

TRENTIN, P. G.; FERREIRA, T. P. T.; ARANTES, A. C. S.; CIAMBARELLA, B. T.; CORDEIRO, R. S. B.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice: Peptide Ac₂₋₂₆ prevents silicosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 12, p. 3058–3071, jun. 2015. <https://doi.org/10.1111/bph.13109>.

VAGO, J. P.; NOGUEIRA, C. R. C.; TAVARES, L. P.; SORIANI, F. M.; LOPES, F.; RUSSO, R. C.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 2, p. 249–258, 1 ago. 2012. <https://doi.org/10.1189/jlb.0112008>.

VAGO, J. P.; TAVARES, L. P.; GARCIA, C. C.; LIMA, K. M.; PERUCCI, L. O.; VIEIRA, É. L.; NOGUEIRA, C. R. C.; SORIANI, F. M.; MARTINS, J. O.; SILVA, P. M. R.; GOMES, K. B.; PINHO, V.; BRUSCOLI, S.; RICCARDI, C.; BEAULIEU, E.; MORAND, E. F.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. The Role and Effects of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper in the Context of Inflammation Resolution. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 10, p. 4940–4950, 15 maio 2015. DOI 10.4049/jimmunol.1401722. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/194/10/4940/98372/The-Role-and-Effects-of-Glucocorticoid-Induced>. Acesso em: 23 fev. 2023.

VAGO, J. P.; TAVARES, L. P.; RICCARDI, C.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Exploiting the pro-resolving actions of glucocorticoid-induced proteins Annexin A1 and GILZ in infectious diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111033, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111033>.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; TUCKERMANN, J.; LIBERT, C. New Insights into the Anti-inflammatory Mechanisms of Glucocorticoids: An Emerging Role for Glucocorticoid-Receptor-Mediated Transactivation. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 993–1007, 1 mar. 2013. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2045>.

VONG, L.; D'ACQUISTO, F.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; LAVAGNO, L.; FLOWER, R. J.; WITKO-SARSAT, V.; PERRETTI, M. Annexin 1 Cleavage in Activated Neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 41, p. 29998–30004, out. 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702876200>.

WRIGHT, T. W.; GIGLIOTTI, F.; FINKELSTEIN, J. N.; MCBRIDE, J. T.; AN, C. L.; HARMSSEN, A. G. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 9, p. 1307–1317, 1 nov. 1999. <https://doi.org/10.1172/JCI6688>.

WUNDERINK, R. G.; MATSUNAGA, Y.; ARIYASU, M.; CLEVENBERGH, P.; ECHOLS, R.; KAYE, K. S.; KOLLEF, M.; MENON, A.; POGUE, J. M.; SHORR, A. F.; TIMSIT, J.-F.; ZEITLINGER, M.; NAGATA, T. D. Cefiderocol versus high-dose, extended-infusion meropenem for the treatment of Gram-negative nosocomial pneumonia (APEKS-NP): a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 213–225, fev. 2021. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30731-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30731-3).

YAMAMOTO, S.; TANABE, M.; WAKABAYASHI, G.; SHIMAZU, M.; MATSUMOTO, K.; KITAJIMA, M. The role of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. **The Journal of Surgical Research**, v. 99, n. 1, p. 134–141, jul. 2001. <https://doi.org/10.1006/jsre.2001.6106>.

YIPP, B. G.; KIM, J. H.; LIMA, R.; ZBYTNUK, L. D.; PETRI, B.; SWANLUND, N.; HO, M.; SZETO, V. G.; TAK, T.; KOENDERMAN, L.; PICKKERS, P.; TOOL, A. T. J.; KUIJPERS, T. W.; VAN DEN BERG, T. K.; LOONEY, M. R.; KRUMMEL, M. F.; KUBES, P. The lung is a host defense niche for immediate neutrophil-mediated vascular protection. **Science Immunology**, v. 2, n. 10, p. eaam8929, 21 abr. 2017. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam8929>.

YONA, S.; HEINSBROEK, S. E. M.; PEISER, L.; GORDON, S.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages: Annexin 1 and phagocytosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 469–477, jun. 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706730>.

YUNNA, C.; MENGURU, H.; LEI, W.; WEIDONG, C. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.

ZAIDAN, I.; TAVARES, L. P.; SUGIMOTO, M. A.; LIMA, K. M.; NEGREIROS-LIMA, G. L.; TEIXEIRA, L. C. R.; MIRANDA, T. C.; VALIATE, B. V. S.; CRAMER, A.; VAGO, J. P.; CAMPOLINA-SILVA, G. H.; SOUZA, J. A. M.; GROSSI, L. C.; PINHO, V.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S.; TEIXEIRA, M. M.; GALVÃO, I.; SOUSA, L. P. Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis. **JCI Insight**, v. 7, n. 1, p. e147819, 11 jan. 2022. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147819>.

ZARAGOZA, R.; VIDAL-CORTÉS, P.; AGUILAR, G.; BORGES, M.; DIAZ, E.; FERRER, R.; MASEDA, E.; NIETO, M.; NUVIALS, F. X.; RAMIREZ, P.; RODRIGUEZ, A.; SORIANO, C.; VEGANZONES, J.; MARTÍN-LOECHES, I. Update of the treatment of nosocomial pneumonia in the ICU. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 383, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03091-2>.

ZHARKOVA, O.; SALAMAH, M. F.; BABAK, M. V.; RAJAN, E.; LIM, L. H. K.; ANDRADE, F.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M.; MORAES, L. A.; VAIYAPURI, S. Deletion of Annexin A1 in Mice Upregulates the Expression of Its Receptor, Fpr2/3, and Reactivity to the AnxA1 Mimetic Peptide in Platelets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3424, 8 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24043424>.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 262/2018

Título do projeto: Estudo do papel da Anexina A1 na sepse experimental e na infecção pulmonar pós sepse

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Lirlandia Pires de Sousa

Unidade: Faculdade de Farmácia

Departamento: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 17/09/2018. Validade: 17/09/2018 à 16/09/2023

Belo Horizonte, 18/09/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

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

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