

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

*Estudo do papel da proteína induzida por glicocorticóide  
Anexina A1 na resolução da resposta inflamatória aguda*

**Juliana Priscila Vago da Silva**

Belo Horizonte  
2012

**Juliana Priscila Vago da Silva**

*Estudo do papel da proteína induzida por glicocorticóide  
Anexina A1 na resolução da resposta inflamatória aguda*

**Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre em Biologia  
Celular.**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa**

Belo Horizonte

2012



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**MESTRADO DE**  
**JULIANA PRISCILA VAGO DA SILVA**

217/2012/09  
entrada  
1º/2011  
2011672168

Às quatorze horas do dia 19 de junho de 2012 reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Estudo do papel da proteína induzida por glicocorticóide Anexina A1 na resolução da resposta inflamatória aguda”**, requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Lirlândia Pires de Sousa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Lirlândia Pires de Sousa	UFMG	APROVADA
Dr. Aristóbolo Mendes da Silva	UFMG	APROVADA
Dra. Fabiana Simão Machado	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de junho de 2012.**

Dra. Lirlândia Pires de Sousa  
(orientadora)

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva

Dra. Fabiana Simão Machado

*Cleide Aparecida de Oliveira*  
Prof. Cleide Aparecida de Oliveira  
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a minha querida família!*

*Aos meus pais, Nilda e Wallace.*

*As minhas irmãs, Ludmila e Amanda.*

*Ao meu amor, Fernando.*

*Obrigada pelo carinho, confiança, apoio, incentivo em todos os momentos!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa, pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela motivação, pela paciência e pela confiança depositava em mim!

A duas pessoas muito importantes que se empenharam e muito contribuíram para realização deste trabalho, Camila e Luciana. Companheiras de lab! Obrigada pelos momentos de descontração, pelo apoio, pelo auxílio!

Aos alunos da Landa: Bruno, Luíza, Aline, Thaís e Raquel, obrigada pela companhia e ajuda de sempre!

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira pelas sugestões sempre muito bem vindas, por abrir as portas do seu laboratório e pela colaboração com o projeto!

A Profa. Dra. Vanessa Pinho que é sempre um amor! Obrigada pela colaboração neste trabalho e disposição! Agradeço também aos seus alunos, Alesandra, Priscila, Albená, Raíssa. Em especial ao Fernando pelo auxílio e colaboração com este trabalho!

Ao Prof. Dr. Frederico Soriani, obrigada pelos ensinamentos e colaboração com o projeto!

Ao Prof. Dr. Remo Russo que sempre me ajuda nos momentos mais difíceis! Obrigada pelo incentivo, pela orientação e pela colaboração neste trabalho!

Ao Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira e aos seus alunos Aline, David, Natália, Norinne e Larissa, que são uns amores!

Ao Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes, obrigada pela confiança!

A Profa. Dra. Danielle Souza e a todo o laboratório de interação microorganismo hospedeiro (LIMHO).

Agradeço muitíssimo à Ilma e a Frank, pelo apoio técnico, sempre me ajudando muito!

A todos os alunos do laboratório de Imunofarmacologia, pelo incentivo, companheirismo e ensinamentos! Em especial a Cris, Aninha e Angélica.

A todo o Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia, por terem me acolhido!

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, do ICB/UFMG pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de realizar esta Dissertação de Mestrado, a todo o corpo docente, especialmente a Profa. Dra. Denise Carmona Cara.

## RESUMO

A resposta inflamatória é inicialmente caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios e pela migração de leucócitos para o local da inflamação. Por outro lado, este processo é finamente controlado pela ação de mediadores anti-inflamatórios e/ou pró-resolutivos que auxiliam na resolução do processo inflamatório e no retorno da homeostase tecidual. Dentre esses mediadores destaca-se a anexina A1 (AnxA1), uma proteína induzida por glicocorticóides (GC) que medeia diversas funções destes anti-inflamatórios. AnxA1 age como um potente modulador endógeno da inflamação, impedindo a ação de enzimas que atuam na produção de mediadores pró-inflamatórios, inibindo a transmigração dos leucócitos e induzindo a fagocitose de células apoptóticas. Assim, o presente estudo investigou a participação de AnxA1 na resolução da resposta inflamatória espontânea e induzida por anti-inflamatórios. Para tal, foi utilizado o modelo murino de pleurisia induzida por LPS (lipolissacarídeo) onde camundongos BALB/c foram injetados com 250  $\eta$ g de LPS por via intrapleural. Posteriormente, as células presentes no lavado pleural foram coletadas em diferentes intervalos pós-injeção e analisadas quanto ao número total e diferencial de leucócitos, número de células com morfologia apoptótica, vias de sinalização envolvidas com apoptose, sobrevivência celular e a expressão da proteína AnxA1. Os resultados mostraram que a injeção de LPS induziu um acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural que foi máximo entre 8-24h, diminuiu em 48h ocorrendo resolução completa no tempo de 72h. A resolução natural, avaliada pelo decréscimo no número de neutrófilos observado nos tempos 48-72h, foi acompanhada pelo aumento de células mononucleares e foi associada ao aumento de eventos apoptóticos entre 8-48h, como demonstrado por critérios morfológicos (contagem de células apoptóticas) e bioquímicos (aumento de caspase-3 clivada e Bax). A proteína AnxA1 na forma ativa intacta (37 kDa) foi detectada em animais injetados com PBS, diminuiu intensamente na fase ativa da inflamação neutrofílica (4-24h) e aumentou durante a resolução natural, como visto em 48-72h após desafio com LPS. Observou-se um predomínio de clivagem da proteína AnxA1 (banda de 33 kDa) nos intervalos de tempo onde ocorreu maior recrutamento de neutrófilos. O tratamento de animais com drogas anti-inflamatórias, as quais foram previamente demonstradas induzirem resolução no mesmo modelo inflamatório, a saber: rolipram (um inibidor de PDE4), wortmannin (inibidor de PI3K) e dexametasona (glicocorticoide sintético) diminuiu o número de neutrófilos na cavidade pleural, com um aumento na expressão da proteína AnxA1 na forma ativa e prevenção da clivagem da mesma. Ainda, o aumento de AnxA1 induzido por estas drogas, foi associado com ativação de

proteínas pró-apoptóticas (aumento de Bax e clivagem de caspase-3) e inibição da fosforilação de proteínas associadas com a sobrevivência celular (P-ERK1/2 e P-I $\kappa$ B- $\alpha$ ). A relevância funcional da AnxA1 para a resolução da pleurisia foi determinada utilizando duas estratégias, um anticorpo neutralizante para a proteína ou um antagonista inespecífico do receptor onde AnxA1 atua (FPR2/ALXR): ambos os tratamentos inibiram a resolução da inflamação espontânea e induzida por dexametasona, a expressão de AnxA1 e a apoptose de neutrófilos. O efeito direto da participação da AnxA1 na resolução da inflamação aguda foi avaliado utilizando Ac2-26, um peptídeo ativo da porção N-terminal da proteína. A injeção de Ac2-26, por duas diferentes vias de administração, local e sistêmica, diminuiu o número de neutrófilos na cavidade pleural, sem alterar o número de células mononucleares, e aumentou a apoptose de neutrófilos, efeito que foi impedido pela injeção do pan inibidor de caspase zVAD-fmk. Mecanicamente, a resolução da inflamação promovida pela injeção do peptídeo Ac2-26 foi associada à apoptose de neutrófilos com aumento de Bax e clivagem de caspase-3, decréscimo dos níveis de Mcl-1 e da fosforilação de P-ERK1/2 e P-I $\kappa$ B $\alpha$ , proteínas já demonstradas serem importantes para sobrevivência do neutrófilo. Nossos dados *in vivo*, utilizando um modelo dinâmico de inflamação aguda, fornecem evidências de que AnxA1 seja um mediador da resolução natural e induzida por anti-inflamatórios com intenso efeito sobre a apoptose de neutrófilos.



## **ABSTRACT**

The inflammatory response is initially characterized by the release of pro-inflammatory mediators and the migration of leukocytes to the inflammation site. On the other hand, this process is finely controlled by the action of anti-inflammatory and/or pro-resolution mediators that promote resolution of inflammation and helps the return to tissue homeostasis. Annexin A1 (AnxA1) is a glucocorticoid (GC)-induced protein that mediates several GC functions. AnxA1 acts as a potent endogenous modulator of inflammation by preventing the action of enzymes that participate in the production of pro-inflammatory mediators, inhibiting the leukocyte transmigration and inducing phagocytosis of apoptotic cells. Thus, this study investigated the role of AnxA1 on the spontaneous and pharmacologically-induced resolution of the inflammatory response. For this, we have used a murine model of pleurisy induced by LPS (lipopolysaccharide) where BALB/c mice were injected with 250  $\eta$ g LPS by intrapleural route. After that, the cells in the pleural lavage were collected at different post-injection intervals and analyzed for total and differential leukocyte count, number of cells with apoptotic morphology, signaling pathways involved in apoptosis and cell survival, and AnxA1 protein expression. Our results have shown that the injection of LPS induced an accumulation of neutrophils in the pleural cavity which was maximal between 8-24h, decreased in 48h with complete resolution occurring at 72h. The natural resolution, showed by the reduction of neutrophils numbers observed at the time of 48-72h, was accompanied by an increase of mononuclear cells and was associated with an increase of apoptotic events between 8-48h, as shown by morphological (apoptotic cells count) and biochemical (increase of caspase-3 cleavage and Bax) criteria. The protein AnxA1 in intact active form (37 kDa) was detected in animals injected with PBS, strongly decreased in the active phase of neutrophilic inflammation (4-24h) and increased during the natural resolution, as seen in 48-72h after LPS challenge. There was a predominance of AnxA1 protein cleavage (33 kDa band) during the time-points of higher neutrophil recruitment. Treatment of animals with anti-inflammatory drugs, which have been previously shown to induce resolution in the same inflammatory model, to know: rolipram (PDE4 inhibitor), wortmannin (PI3K inhibitor) and dexametasone (synthetic glucocorticoid) decreased the number of neutrophils into the pleural cavity, with an increase of AnxA1 active form expression and prevention of its cleavage. Also, the increase of AnxA1 induced by these drugs has been associated with activation of pro-apoptotic proteins (increase of Bax and caspase-3 cleavage) and decreased

phosphorylation of cell survival associated proteins (P-ERK1/2 and P-IKB- $\alpha$ ). The functional relevance of AnxA1 for the resolution of pleurisy was determined using two strategies, a neutralizing antibody or a non-specific antagonist at FPR2/ALXR (the receptor which AnxA1 acts): both treatments inhibited spontaneous and dexamethasone-induced resolution of inflammation, expression of AnxA1 and apoptosis of neutrophils. The direct role of AnxA1 on the resolution of acute inflammation was evaluated using Ac2-26, an active peptide of the N-terminal portion of the protein. The injection of Ac2-26, by two different routes of administration, local and systemic, decreased the number of neutrophils in the pleural cavity, without modifying mononuclear cell numbers and increased apoptosis of neutrophils, an effect that was prevented by the injection of the pan caspase inhibitor zVAD-fmk. Mechanistically, the resolution of inflammation promoted by injection of Ac2-26 peptide was associated with neutrophil apoptosis with increase of Bax and caspase-3 cleavage, decrease of levels of Mcl-1, ERK1/2 and Ikb- $\alpha$  phosphorylation, important proteins associated with neutrophil survival. Our data *in vivo*, using a dynamic model of acute inflammation, provide evidence that AnxA1 is a mediator of natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation with profound effect on neutrophils apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Representação esquemática da adesão de neutrófilos e migração transendotelial .....	20
<b>FIGURA 2</b> - Representação esquemática dos elementos celulares e moleculares da resposta inflamatória e da resolução .....	22
<b>FIGURA 3</b> - Representação estrutural da proteína Anexina A1 humana.....	26
<b>FIGURA 4</b> - Representação esquemática da mobilização de AnxA1 em células ativadas e seu mecanismo de ação .....	28
<b>FIGURA 5</b> - Efeito dos glicocorticóides, AnxA1, e seus peptídeos bioativos no tráfego de leucócitos durante a resposta inflamatória.....	31
<b>FIGURA 6</b> - Vias de sinalização da apoptose .....	33
<b>FIGURA 7</b> - Cinética do recrutamento celular durante a pleurisia induzida por LPS .....	43
<b>FIGURA 8</b> - Cinética da apoptose de neutrófilos e expressão de vias de apoptose e sobrevivência celular durante a pleurisia induzida por LPS.....	45
<b>FIGURA 9</b> - Cinética do acúmulo de AnxA1 durante a pleurisia induzida por LPS.....	46
<b>FIGURA 10</b> - Efeito de drogas anti-inflamatórias durante a pleurisia induzida por LPS.....	47
<b>FIGURA 11</b> - Efeito do tratamento com drogas anti-inflamatórias nos níveis de AnxA1 e proteínas associadas com apoptose e sobrevivência celular .....	48
<b>FIGURA 12</b> - Efeito do tratamento com anticorpo anti-AnxA1 na resolução da inflamação aguda natural e induzida por dexametasona .....	50
<b>FIGURA 13</b> - Efeito do tratamento com Boc-1, um antagonista do receptor FPR/ALXR na resolução da inflamação aguda natural e induzida por dexametasona.....	51

<b>FIGURA 14</b> - Efeito da administração de Ac2-26, um peptídeo N-terminal de AnxA1, durante a pleurisia induzida por LPS .....	52
<b>FIGURA 15</b> - Efeito da administração de Ac2-26, um peptídeo N-terminal de AnxA1, na apoptose de neutrófilos .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABC:** *ATP-binding cassette* – transportador ABC

**ALXR:** *lipoxin A4 receptor* – receptor de lipoxina A4

**AMP cíclico:** adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

**ANOVA:** análise de variância

**AnxA1:** anexina A1

**APAF-1:** *apoptotic protease activating factor 1* – fator de ativação de protease associado a apoptose 1

**AP-1:** proteína ativadora 1

**ATP:** adenosina trifosfato

**BAL:** lavado bronco-alveolar

**BALB/c:** linhagem de camundongos albinos BALB/c

**Bcl-xL:** *B-cell lymphoma-extra large*

**BSA:** *bovine serum albumin* – soro albumina bovina

**Boc-1:** N-t-Boc-Met-Leu-Phe

**Caspase:** *cysteine-dependent aspartate-directed* – proteases cisteína-dependente e aspartato-específicas

**CREB:** *cAMP responsive element-binding protein* – proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP

**COX-2:** cicloxigenase-2

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

**DISC:** complexo de sinalização indutor de morte

**DMSO:** dimetilsufóxido

**DTT:** ditioneitol

**ERK1/2:** *extracellular signal-regulated kinase* – quinase regulada por sinal extracelular

**EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético

**FADD:** *Fas-associated protein with death domain* – proteína com domínio de morte associada à Fas

**FPR:** receptor de formil peptídeo

**GC:** glicocorticóide

**GCR:** *glucocorticoid cytosolic receptor* – receptor de glicocorticóide citosólico

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

**GPCR:** *G protein coupled receptors* – receptor transmembrânico acoplado à proteína G

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

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HOCl:** ácido hipocloroso

**ICAM-I:** *intercellular adhesion molecule-I* – molécula de adesão intercelular-I

**iNOS:** *inducible nitric oxide synthase* – sintase induzida do óxido nítrico

**IL-():** interleucina-()

**i.pl.:** intrapleural

**i.p.:** intraperitonal

**JAM:** *junctional adhesion molecule* – molécula de adesão juncional

**JNK:** *c-Jun N-terminal kinase* – cinase c-Jun N-terminal

**kDa:** quilo Dálton

**Kg:** quilograma

**LPS:** lipopolissacarídeo

**M:** molar

**MAPK:** *mitogen-activated protein kinase* – proteína cinase ativada por mitógeno

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

**mg:** miligrama

**mL:** mililitro

**mM:** milimolar

**MKP-1:** *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1* – fosfatase da MAPK

**MPO:** mieloperoxidase

**NaCl:** cloreto de sódio

**NaF:** fluoreto de sódio

**NaVO<sub>3</sub>:** vanadato de sódio

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

**NF-κB:** fator nuclear kappa B

**NIS:** soro não imune de ovelha

**NO:** óxido nítrico

**nm:** nanômetro

**NP-40:** nonilfenol etoxilado

**PAMP:** *pathogen associated molecular pattern* – padrão molecular associado a patógenos

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

**PDE4:** fosfodiesterase 4

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

**PG:** prostaglandina

**pH:** potencial hidrogeniônico

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinase

**PLA2:** fosfolipase A2

**PMN:** polimorfonuclear

**PMSF:** *phenylmethanesulphonyl fluoride* – fenilmetilsulfonilfluoreto

**PR3:** proteinase-3

**p/v:** porcentagem entre peso do soluto e o volume da solução

**ROS:** espécie reativa de oxigênio

**r.p.m.:** rotação por minuto

**SDS:** dodecilsulfato de sódio

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

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

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

**Tris/HCl:** tampão tris hidroximetil aminometano com ácido clorídrico

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

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

**5-HT:** serotonina

**$\mu$ L:** microlitro

**$\mu$ g:** micrograma

**$\eta$ g:** nanograma

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 - Inflamação.....	18
1.1.1 - Recrutamento de leucócitos.....	19
1.1.2 - Neutrófilos.....	20
1.1.3 - Resolução da Resposta Inflamatória .....	21
1.2 - Glicocorticóides .....	23
1.3 - Anexina A1 .....	25
1.3.1 - Estrutura da AnxA1.....	26
1.3.2 - Mecanismos de liberação e clivagem de AnxA1 .....	27
1.3.3 - Funções de AnxA1 .....	30
1.4 - Apoptose .....	31
1.4.1 - Evidências da participação de AnxA1 na apoptose de leucócitos .....	34
1.5 - Vias de sinalização envolvidas com sobrevivência celular.....	34
<b>2 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....</b>	<b>36</b>
<b>3 - OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 - Objetivo Geral.....	37
3.2 - Objetivos Específicos.....	37
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 - Modelo murino de pleurisia induzido por LPS .....	38
4.2 - Processamento das células .....	38
4.2.1 - Contagem total e diferencial de células .....	38
4.2.2 - Obtenção dos extratos celulares .....	39
4.2.3 - Dosagem de proteínas totais no lavado pleural.....	39
4.2.4 - Western Blot para análise da expressão de AnxA1 e da ativação de vias sinalizadoras intracelulares .....	39
4.3 - Tratamentos.....	40
4.3.1 - Tratamento com fármacos que induzem a resolução da resposta inflamatória.....	40
4.3.2 - Tratamento com anti-AnxA1 ou com antagonista inespecífico do receptor de AnxA1... ..	40
4.3.3 - Tratamento com peptídeo Ac2-26.....	41
4.3.4 - Tratamento com zVAD-fmk .....	41
4.4 - Análise da apoptose de leucócitos.....	41



4.5 - Análises estatísticas.....	42
<b>5 - RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1 - A resolução natural da pleurisia induzida por LPS foi acompanhada da apoptose de neutrófilos.....	43
5.2 - A resolução natural da pleurisia induzida por LPS foi acompanhada pelo aumento de AnxA1 .....	46
5.3 - A resolução induzida por drogas anti-inflamatórias promove o acúmulo de AnxA1 associado com ativação de vias de apoptose e regulação de vias de sobrevivência celular.....	47
5.4 - O bloqueio de AnxA1 previne a resolução natural e induzida por dexametasona.....	49
5.5 - Administração de Ac2-26, um peptídeo sintético da porção N-terminal de AnxA1, promove a resolução da inflamação através da indução da apoptose de neutrófilos .	52
<b>6 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>8 - PERSPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>9 - REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>10 - ANEXOS .....</b>	<b>74</b>

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Inflamação

O reconhecimento do processo inflamatório data desde a antiguidade. Aparentemente, o primeiro a definir os sintomas clínicos da inflamação foi o médico romano no século 1 D.C., Cornelius Celsus. Estes sintomas foram descritos como os quatro sinais cardinais da inflamação: o *rubor* (vermelhidão, devido à hiperemia), *tumor* (inchaço, causado por aumento da permeabilidade da microvasculatura e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), *calor* (calor, associado com o aumento fluxo sanguíneo), e *dolor* (dor, em parte devido a alterações nas terminações nervosas). *Functio laesa* (perda da função, disfunção dos órgãos envolvidos) foi descrito como a quinta característica da inflamação por Rudolf Virchow em 1858 (MEDZHITOV, 2010). No final do século 19, Elie Metchnikoff introduziu o conceito de fagocitose, um aspecto fundamental da imunidade inata. Sua contribuição enfatizou os aspectos benéficos da inflamação e apontou o papel chave de macrófagos e micrófagos (neutrófilos), tanto na defesa do hospedeiro quanto na manutenção da homeostase do tecido (MEDZHITOV, 2010). Estas descobertas contribuíram para uma nova visão do processo inflamatório baseando-se em eventos celulares e, desde então, existe um amplo interesse em entender os mecanismos envolvidos neste complexo processo fisiológico.

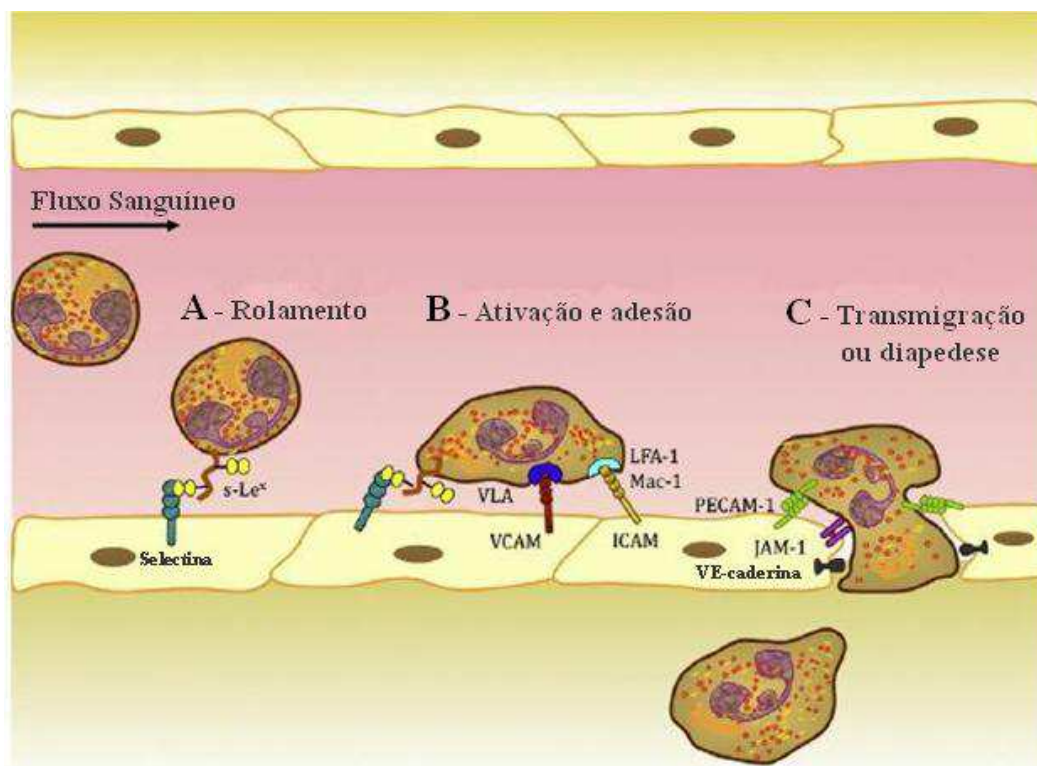
A inflamação é um processo que ocorre em resposta a diversos agentes lesivos, como por exemplo, agentes infecciosos, traumas, tumores ou de natureza auto-imune. É caracterizado por eventos microscópicos e macroscópicos ocorrendo alterações na microcirculação tais como os fenômenos angiogênicos, liberação de moléculas solúveis, acumulação de leucócitos especificamente leucócitos polimorfonucleares (PMN) seguido pelos monócitos, que se diferenciam localmente em macrófagos (NATHAN *et al.*, 2002; NORLING e SERHAN, 2010). A inflamação é parte de um benéfico sistema de defesa que foi aperfeiçoado e conservado evolutivamente ao longo de milhões de anos (MARCHALONIS *et al.*, 2002). Esse processo é geralmente protetor e serve para manter a homeostase tecidual, mas se não controlado se torna deletério ao hospedeiro progredindo para a inflamação crônica, cicatrização e fibrose. Em quase todos os casos, a causa fundamental do dano tecidual é a acumulação excessiva de leucócitos. Por outro lado, na reação inflamatória limitada pelo organismo, o recrutamento de leucócitos é acoplado à liberação de fatores locais

que previnem futuro ou excessivo recrutamento de leucócitos permitindo a resolução do processo (NORLING e SERHAN, 2010).

### **1.1.1 - Recrutamento de leucócitos**

O recrutamento de leucócitos ocorre em condições normais, como por exemplo, o tráfego de linfócitos para tecidos linfóides e outros tecidos. Durante o processo inflamatório, a migração de leucócitos é minuciosamente regulada pela ação de mediadores pró e anti-inflamatórios que promovem e controlam o extravasamento dessas células evitando assim uma exacerbação da resposta inflamatória (GILROY *et al.*, 2004).

Durante uma resposta inflamatória um complexo conjunto de moléculas são produzidas e secretadas em resposta ao tecido lesado, o que resulta na quimiotaxia dos leucócitos e permite a interação de células circulantes com as células endoteliais, possibilitando a transmigração dos leucócitos para um sítio inflamatório (GILROY *et al.*, 2004). A liberação desses mediadores pró-inflamatórios por células residentes (macrófagos, células dendríticas e células epiteliais) no tecido lesado, ativam os neutrófilos circulantes e induz mudanças rápidas e severas nas propriedades de adesão das células endoteliais, causando um aumento da adesão entre os leucócitos e o endotélio promovendo o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (NOURSHARGH e MARELLI, 2005). O recrutamento de leucócitos do sangue para o tecido (Figura 1), envolve um contato inicial com o endotélio vascular, sendo este um processo mediado por moléculas de adesão específicas, presentes nos leucócitos e nas células endoteliais, como por exemplo, selectinas (L, P e E), integrinas, moléculas de adesão intercelular (ICAM-1, 2 e 3), moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e moléculas de adesão celular plaqueta-endotélio (PECAM-1) (SIMON e GREEN, 2005; YUAN *et al.*, 2012). Os fatores quimiotáticos ativam receptores que são caracterizados pela presença de sete domínios transmembrânicos em associação com a proteína G. A ligação desses fatores quimiotáticos aos seus respectivos receptores é capaz de ativar inúmeras moléculas pertencentes às vias de transdução de sinal intracelular que são fundamentais para que a resposta inflamatória ocorra (MARINISSEN e GUTKIND, 2001).



**Figura 1. Representação esquemática da adesão de neutrófilos e migração transendotelial.** Em resposta a estímulos inflamatórios, ocorre aumento das moléculas de adesão (selectinas) em neutrófilos e células endoteliais. Os neutrófilos rolam ao longo da parede endotelial vascular através de interações fracas mediadas pelas selectinas (A). Posteriormente, ocorre uma adesão firme dos neutrófilos ao endotélio através de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM) na superfície da célula endotelial e integrinas (Mac-1 e VLA) na superfície do neutrófilo (B). Subsequentemente, os neutrófilos transmigram através do endotélio vascular por meio de um processo que envolve interações complexas com moléculas juncionais do endotélio, VE-caderina, JAMs e PECAM-1 (C). Adaptado de YUAN *et al.*, 2012.

### 1.1.2 – Neutrófilos

Os neutrófilos são as principais células de defesa efetoras da imunidade inata, representando o maior grupo de leucócitos encontrados no sangue. Estes leucócitos polimorfonucleares são produzidos na medula óssea a partir de células tronco mielóides e na circulação possuem uma meia vida de 6 a 8 horas. Após migrar para o tecido, a meia-vida dos neutrófilos é prolongada por 3-5 dias principalmente por mediadores inflamatórios produzidos localmente como o leucotrieno B<sub>4</sub>, complemento C5a, IL-8 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o que garante tempo suficiente para exercer suas ações antibacteriana e fagocitária

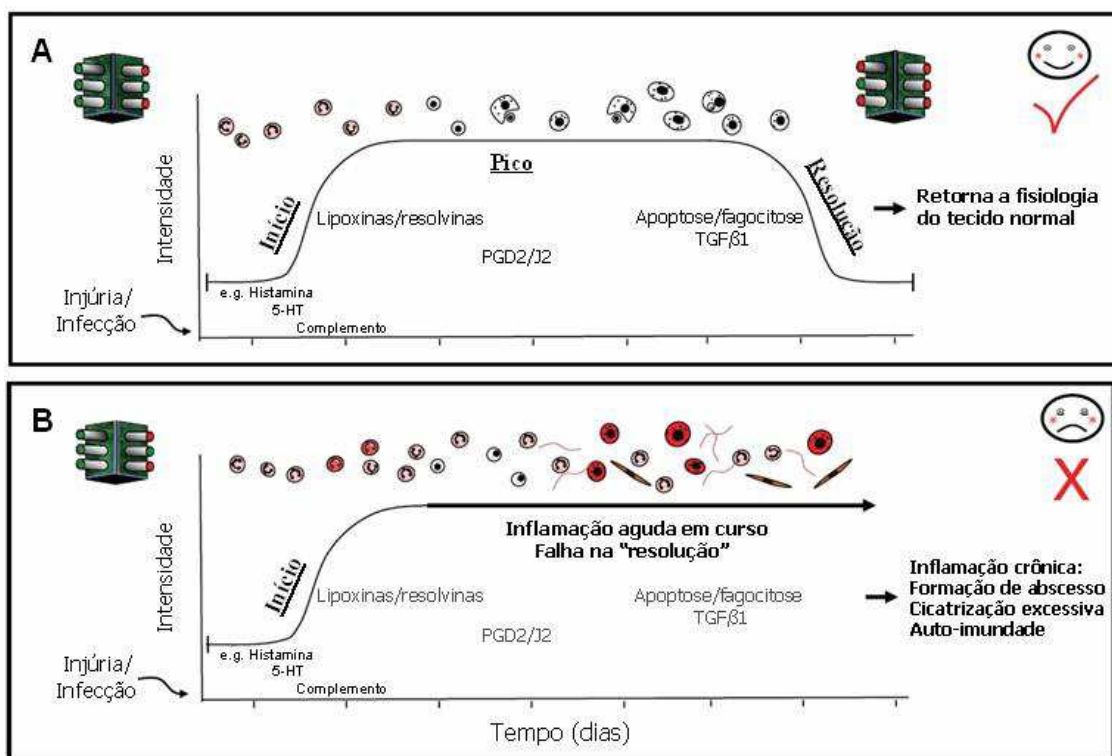
(PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009; SUMMERS *et al.*, 2010). Os neutrófilos agem no reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados ao dano celular), através de receptores do tipo *Toll Like* (TLRs), ou outros receptores da resposta imunes inata, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular e ativação de genes pró-inflamatórios. Um dos receptores mais estudados é o TLR4, que medeia respostas às bactérias Gram negativas, reconhecendo um lipopolissacarídeo de membrana, o LPS (PRINCE *et al.*, 2011).

Quando ativados por mediadores inflamatórios ou por peptídios bacterianos, os neutrófilos aumentam a expressão de moléculas de adesão, migram para os tecidos em direção a um gradiente quimiotático, aumentam sua capacidade fagocítica e produzem fatores importantes que são efetores da resposta neutrofílica. Estes produtos funcionam como amplificadores do processo inflamatório aumentando a sobrevivência dos neutrófilos no local da inflamação e, conseqüentemente, contribuindo para uma maior extensão do foco inflamatório. Os neutrófilos apresentam grânulos que contém produtos tóxicos bactericidas como mieloperoxidase (MPO), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido hipocloroso (HOCl), proteinase-3 (PR3), gelatinases, collagenases, elastases, metaloproteinases e fosfolipase A2 (PLA2). Estes grânulos se fundem com a membrana plasmática e seus produtos são secretados para o meio extracelular (BURG *et al.*, 2001; SAFFAR *et al.*, 2011). Desta forma, a permanência dos neutrófilos no sítio inflamatório pode levar ao dano tecidual.

### **1.1.3 - Resolução da Resposta Inflamatória**

A resolução da inflamação é um processo ativo e bem coordenado, controlado por mediadores endógenos. O início da inflamação aguda é caracterizado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios que atraem células efetoras para o foco inflamatório. Esse processo normalmente é auto-limitante já que ocorre um balanço entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios. Em resposta a injúria ou infecções, os neutrófilos migram para o sítio inflamatório neutralizando e eliminando estímulos potencialmente deletérios. Com o fim do estímulo, ocorre diminuição dos mediadores pró-inflamatórios no local, através da diminuição da síntese e aumento do catabolismo dos mesmos. Em adição à esses eventos, ocorre liberação de fatores pró-resolutivos que previnem a formação de edema e migração de polimorfonucleares. Estes eventos marcam o início do processo resolutivo que irá restabelecer a homeostase tecidual (Figura 2) (SERHAN *et al.*, 2007).

Uma resolução bem sucedida irá limitar a lesão tecidual, impedindo a progressão da inflamação. No entanto, se o hospedeiro não for capaz de conter o agente agressor ou ocorrerem falhas nos mecanismos pró-resolutivos, a inflamação pode perpetuar resultando em diferentes graus de lesão tecidual. Se a lesão tecidual for leve, as células serão substituídas por novas células em um processo conhecido como regeneração. No entanto, se o dano tecidual for extenso, como ocorre nas inflamações crônicas, as células lesadas serão substituídas, ocorrendo deposição de colágeno e cicatrização, um processo que muitas vezes leva a perda da função do órgão (GILROY *et al.*, 2004).



**Figura 2. Representação esquemática dos elementos celulares e moleculares da resposta inflamatória e da resolução.** O início da resposta inflamatória é caracterizado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios que aumentam a permeabilidade da parede endotelial com conseqüente formação de edema e recrutamento de PMN seguido por macrófagos. No entanto, mediadores anti-inflamatórios endógenos atenuam a severidade da resposta, promovendo apoptose de neutrófilos e sua remoção por fagócitos. Esse conjunto seqüencial de respostas leva a resolução completa e, sobretudo, a restauração do tecido inflamado (A). Em contrapartida, em algumas situações patológicas onde ocorre acúmulo excessivo de neutrófilos ou falha no sistema de resolução, o processo progride para inflamação crônica (B). 5-HT = serotonina; PG = prostaglandina; TGF-β = fator de crescimento transformante beta.

Adaptado de SERHAN *et al.*, 2007.

A apoptose de neutrófilos seguida pelo reconhecimento e remoção por macrófagos é um processo crucial na resolução da inflamação aguda. Os leucócitos PMN são os primeiros a chegar ao sítio inflamatório, seguido pela migração de monócitos, que se diferenciam localmente em macrófagos. Os primeiros macrófagos apresentam um perfil pró-inflamatório e são chamados M1. Estes macrófagos apresentam baixa capacidade fagocítica e estão envolvidos com a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Após a fagocitose, os macrófagos mudam seu fenótipo para M2 e produzem moléculas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ), produzindo também mediadores pró-resolutivos que impedem o recrutamento de PMN adicionais e promovem o recrutamento de monócitos amplificando a eficiência do processo de fagocitose. Estes macrófagos estão envolvidos com o reparo de tecidos e tem um papel importante no retorno da homeostase tecidual. Os macrófagos M2 possuem alta capacidade fagocítica e, uma vez desempenhado seu papel de remoção de células apoptóticas mudam novamente seu fenótipo para Mres (macrófago resolutivo). O Mres está envolvido com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, pró-resolutivos e anti-fibróticos, sendo posteriormente drenado pelos vasos linfáticos (ARIEL e SERHAN, 2012).

Assim, durante a resolução do processo inflamatório uma série de eventos contribui para o término da resposta inflamatória. A vasodilatação e formação de edema contribuem para a redução das concentrações efetivas do estímulo inflamatório, os leucócitos recrutados eliminam o agente efetor, os mediadores inflamatórios são desativados espontaneamente ou enzimaticamente, moléculas com função inibitória ou pró-resolutivas são produzidas e as células inflamatórias são eliminadas por apoptose seguida de fagocitose pelos macrófagos. (GILROY *et al.*, 2004, SERHAN e SAVILL, 2005; SERHAN *et al.*, 2007). Após a eliminação do agente causador da lesão é importante que as células e mediadores presentes no local também sejam excluídos restabelecendo a integridade do tecido. Dessa forma, um evento importante durante os processos inflamatórios seria a resolução adequada dos eventos efetores dessa resposta.

## **1.2 - Glicocorticóides**

Glicocorticoides (GCs) são potentes agentes anti-inflamatórios e imunossupressores que são amplamente explorados terapeuticamente para o tratamento de várias condições inflamatórias. A habilidade dos GCs endógenos em suprimir a expressão de uma variedade de

genes pró-inflamatórios e induzir certos genes anti-inflamatórios têm sido muito explorado no tratamento de doenças inflamatórias com a utilização de GCs exógenos. Durante a inflamação, os GCs endógenos são produzidos pelas glândulas supra-renais e desempenham um papel crítico na resolução da inflamação. O amplo espectro dos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos GCs depende de seus efeitos sobre vias de sinalização (transrepressão), tais como NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) e AP-1 (proteína ativadora 1), bem como na indução gênica (transativação) de proteínas anti-inflamatórias. Por outro lado, os efeitos colaterais metabólicos dos GCs parecem ser dependentes da indução da expressão gênica. Estes efeitos colaterais são mais evidentes nos tratamentos com altas dosagens e por longos períodos podendo ocasionar osteoporose, intolerância a glicose (diabetes), retenção de sódio (hipertensão), miopatias, catarata e atrofia da pele. Além disso, os GCs podem aumentar a susceptibilidade às infecções (devido à imunossupressão), além de ocasionar resistência. (CLARK, 2007; STAHN *et al.*, 2007; BEAULIEU e MORAND, 2011).

A maioria dos efeitos anti-inflamatórios do GCs é desencadeada pela ação gênica, que leva a uma regulação positiva ou negativa da síntese de proteínas. O processo se inicia pela passagem do GC (lipofílico), pela membrana plasmática da célula alvo, por difusão passiva. No citoplasma, o GC se liga ao seu receptor (*GCR-gluocorticoid cytosolic receptor*) que são proteínas citoplasmáticas com estrutura contendo domínios comuns a outros membros da superfamília de receptores nucleares. Estes receptores atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes alvo em resposta a um sinal hormonal específico. O complexo GC-receptor sofre transformação estrutural e se torna capaz de penetrar no núcleo celular no qual se liga a regiões promotoras de genes, denominadas elementos responsivos aos GCs (*GRE-gluocorticoid responsive elements*), resultando na indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias como a anexina A1, I $\kappa$ B e IL-10, e de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico. Este processo é chamado de transativação e a maioria dos efeitos adversos associados aos CGs parece estar relacionada a este mecanismo. Os GCs também atuam por meio de outro mecanismo gênico chamado de transrepressão em que monômeros de moléculas de GC e receptores de GC interagem com fatores de transcrição envolvidos com a regulação de genes pró-inflamatórios como o NF- $\kappa$ B e AP-1. A inibição desses fatores de transcrição resulta na inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios como: citocinas, prostaglandinas, dentre outros (SONG *et al.*, 2005; CLARK, 2007; STAHN *et al.*, 2007).

Além dos mecanismos gênicos de transrepressão e transativação, existem os mecanismos não gênicos, que estão associados aos efeitos rápidos dos GCs. Embora seja fácil



distinguir a ação gênica da não gênica, ainda existe controvérsia sobre a identidade dos receptores que iniciam os fenômenos não gênicos. A ação não gênica não requer síntese de novo e frequentemente envolve a geração de segundos mensageiros intracelulares. Várias cascatas de transdução de sinais parecem estar envolvidas com esse mecanismo como, por exemplo, a modulação do AMP cíclico, modulação do fluxo de íons cálcio e ativação de proteínas cinases (LÖSEL e WEHLING, 2003). No entanto, não é claro como os efeitos não gênicos contribuem para a eficácia terapêutica dos GCs no controle de doenças inflamatórias.

Desta forma, o postulado de que os efeitos anti-inflamatórios dos GCs sejam devido à transrepressão gênica (inibindo principalmente NF- $\kappa$ B e AP-1) enquanto os efeitos metabólicos sejam devidos à transativação (indução gênica), carece de estudos adicionais uma vez que várias proteínas com propriedades anti-inflamatórias são induzidas por GCs. Dentre estas, destacam-se a Anexina A1, GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper*) e MKP-1 (*mitogen-activated protein kinase*). O conhecimento das propriedades anti-inflamatórias destas e de outras proteínas induzidas por GCs pode levar ao desenvolvimento de fármacos que extrairiam as características benéficas dos GCs excluindo os efeitos deletérios dos mesmos sobre o metabolismo (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009; BEAULIEU e MORAND, 2011).

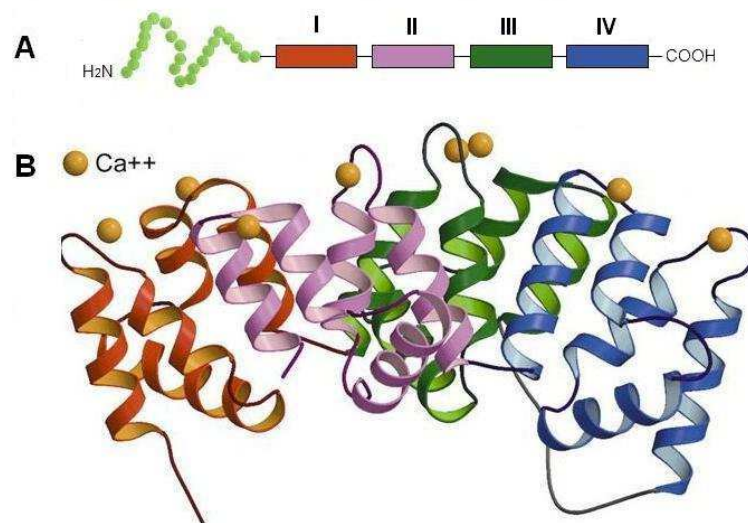
### **1.3 - Anexina A1**

Descrita pela primeira vez por Flower e Blackwell em 1979, Anexina A1 (AnxA1) também conhecida como lipocortina 1, é uma proteína induzida por GCs, que inibe a síntese de eicosanóides através da inibição de fosfolipase A2, mimetizando várias das ações anti-inflamatórias dos GCs (FLOWER, 1988). A AnxA1 é uma proteína de 37 kDa da superfamília das anexinas, que é constituída por pelo menos 13 proteínas relativamente abundantes e estruturalmente semelhantes (GERKE e MOSS, 2002). O termo “anexina” deriva de “anexar”, relacionado a algumas funções que estas proteínas têm em comum como a capacidade de ligação a fosfolipídios de membrana, um processo que ocorre de forma dependente de Ca<sup>2+</sup> (GERKE *et al.*, 2005). Apesar das semelhanças estruturais, as anexinas variam entre si em pelo menos duas propriedades: a afinidade para os diferentes tipos de fosfolipídios e a concentração de Ca<sup>2+</sup> necessária para a ligação aos fosfolipídios (ERNST *et*

*al.*, 1994). Dessa forma, as anexinas diferem também em relação à sua localização celular e, conseqüentemente, à função biológica que desempenham.

### 1.3.1 - Estrutura da AnxA1

Estruturalmente, as anexinas são constituídas por dois domínios (Figura 3): uma cauda na extremidade amino (N-terminal), que apresenta características variáveis de comprimento e composição de acordo com o tipo de proteína, e por um domínio central na proximidade da extremidade carboxílica (C-terminal), uma região com maior grau de conservação entre os membros da família das anexinas (KIM *et al.*, 2001). Esta última região contém quatro a oito repetições de uma seqüência conservada de 70-80 aminoácidos que constitui a estrutura primária comum de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , a fosfolipídios e também ao ATP (RAYNAL e POLLARD, 1994). O domínio N-terminal é específico para cada membro da família das anexinas e interage com os diferentes ligantes destas proteínas ocorrendo fosforilação, glicosilação, ação de peptidases e clivagem proteolítica seletiva (LEE *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001).



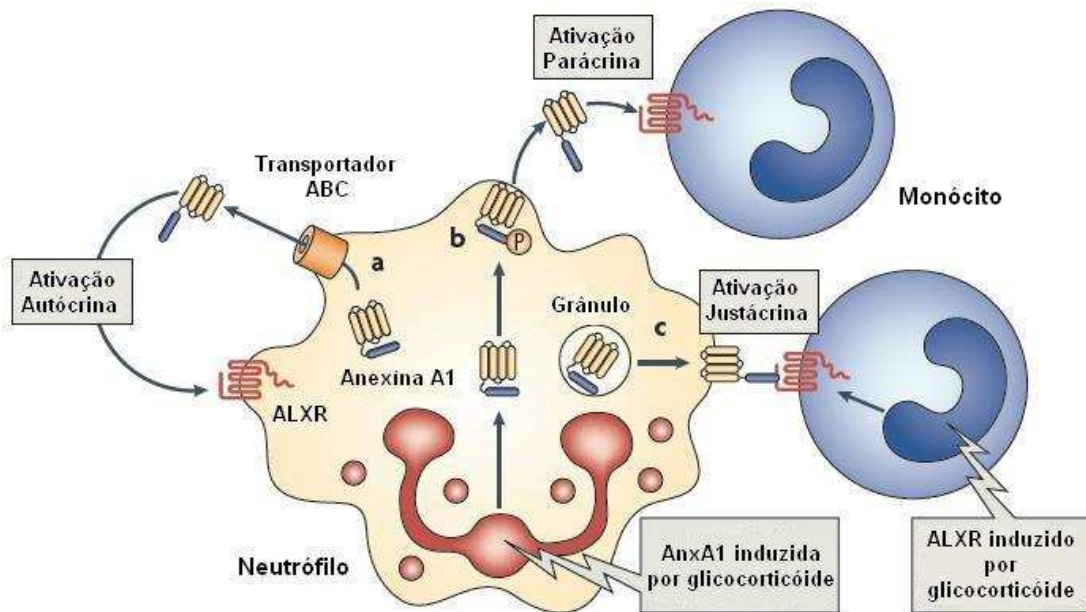
**Figura 3. Representação estrutural da proteína Anexina A1 humana.** Representação da estrutura primária (A) e tridimensional (B). O domínio C-terminal é responsável pela afinidade da proteína ao cálcio e é constituído por quatro seqüências de aminoácidos que se repetem, representadas pelos números de I a IV. A região N-terminal é constituída por 44 aminoácidos e tem sido caracterizada como promotora da ação anti-inflamatória da proteína.

Adaptado de RESCHER e GERKE, 2004.

### 1.3.2 - Mecanismos de liberação e clivagem de AnxA1

Em condições normais, altos níveis de AnxA1 intacta são constitutivamente expressos no citoplasma de neutrófilos, monócitos e macrófagos. A concentração intracelular de AnxA1 varia significativamente dependendo do tipo celular, constituindo normalmente 0,5% a 2% das proteínas totais da célula (PEPINSKY *et al.*, 1986; SOLITO *et al.*, 1998). No entanto, o conteúdo intracelular de AnxA1 é particularmente abundante nas células diretamente envolvidas na resposta inflamatória, tais como monócitos, macrófagos e neutrófilos do sangue periférico, podendo atingir cerca de 4% das proteínas solúveis totais (GOULDING *et al.*, 1990; MORAND *et al.*, 1994).

Os mecanismos moleculares que são responsáveis pela secreção da AnxA1 são célula específicos. Após ativação celular, a AnxA1 intracelular é ativamente mobilizada para a membrana plasmática e é então externalizada e/ou secretada por um dos seguintes mecanismos: ativação do transportador ABC (*ATP-binding cassette*), fosforilação do resíduo de serina na porção N-terminal, ou fusão de grânulos de gelatinase contendo AnxA1 com a membrana plasmática (Figura 4). AnxA1 se liga à membrana plasmática de maneira  $\text{Ca}^{2+}$  dependente. Na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , em concentrações maiores que 1mM, a AnxA1 extracelular sofre uma mudança conformacional que leva a exposição da região N-terminal e ligação ao seu receptor ALX (também conhecido com FPR2 murino ou FPRL1 humano). A AnxA1 pode ativar a sinalização por mecanismos autócrinos, parácrinos ou justácrinos (contato célula-célula), envolvendo interação entre a AnxA1 na superfície da célula secretora e o receptor ALX da célula alvo (Figura 4). Este parece ser o mecanismo de ação mais plausível em condições inflamatórias (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009).



**Figura 4. Representação esquemática da mobilização de Anx1 em células ativadas e seu mecanismo de ação.** Após ativação celular, a Anx1 intracelular é mobilizada para a membrana plasmática e externalizada pelos seguintes mecanismos: ativação do transportador ABC (a); fosforilação do resíduo de serina (b) e fusão do grânulo com a membrana plasmática (c). Adaptado de PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009.

Neutrófilos ativados podem externalizar grandes quantidades da Anx1 citoplasmática (>50%). A Anx1 exposta sobre a membrana plasmática do leucócito aderente exerce uma ação inibitória, reduzindo a transmigração através das células endoteliais (PERRETTI e FLOWER, 1996). A Anx1 intacta (37 kDa) pode ser encontrada no citoplasma de neutrófilos circulantes ou na membrana plasmática dos neutrófilos intravasculares aderidos ao endotélio. Uma vez no espaço extravascular, a maior parte da proteína contida nos neutrófilos é clivada na região N-terminal, dando origem a Anx1 de 33 kDa. A região N-terminal é caracterizada como promotora da ação anti-inflamatória da Anx1. Alguns resultados experimentais utilizando o peptídeo sintético contendo a mesma seqüência de aminoácidos, denominado Ac2-26, confirmaram a presença desse sítio ativo nessa região, o qual é efetivo em atenuar vários parâmetros da resposta inflamatória quando utilizado em modelos experimentais de inflamação (HARRIS *et al.*, 1995; OLIANI *et al.*, 2001; PERRETTI e GAVINS, 2003, SOUZA *et al.*, 2007).

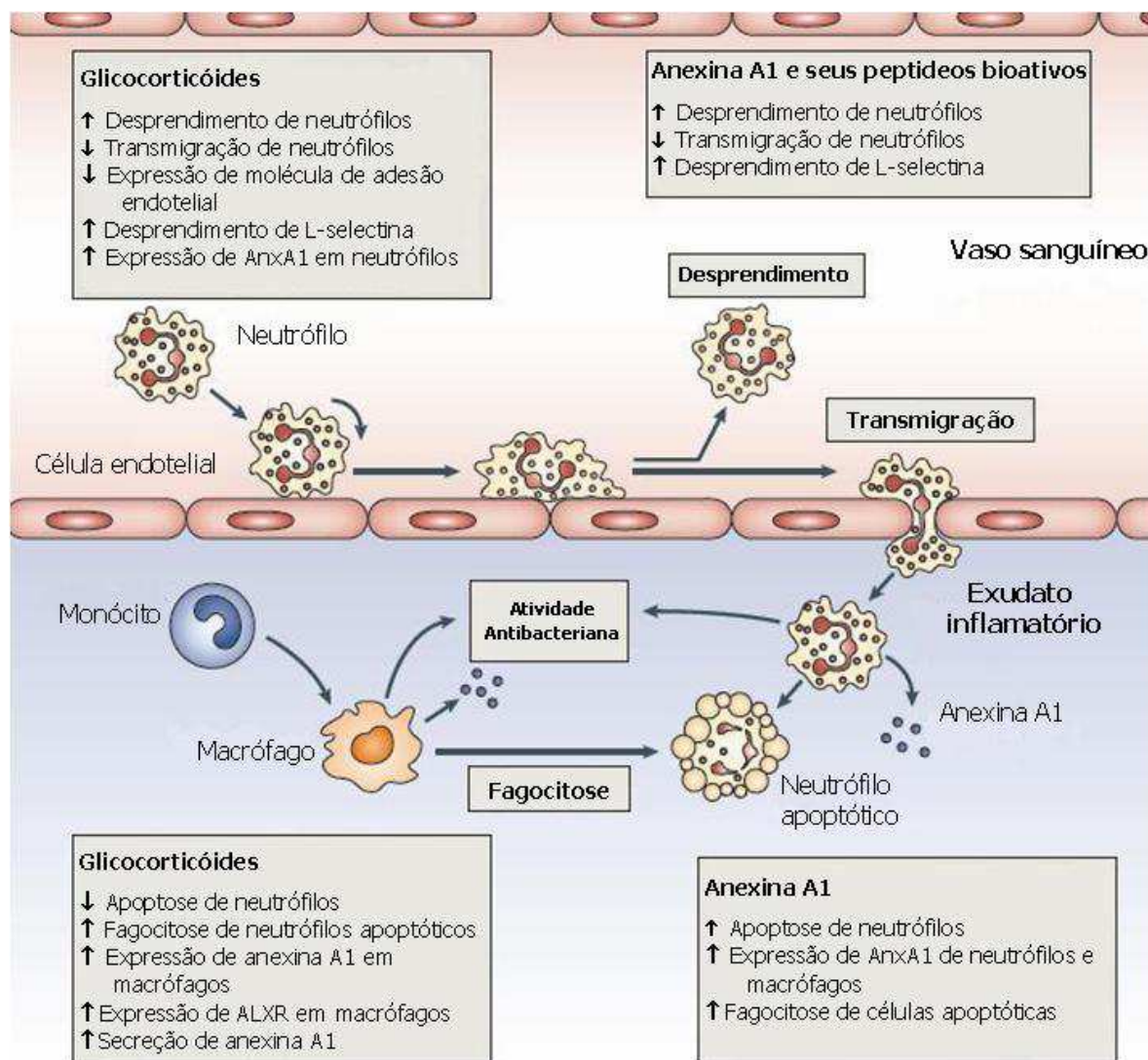
A sinalização de AnxA1 ocorre através de um receptor transmembrânico acoplado a proteína G (GPCR) denominado receptor de formil peptídeo 2 (FPR2), também conhecido com ALXR em humanos, que é também o receptor da molécula anti-inflamatória lipoxina A<sub>4</sub>. O receptor FPR2 faz parte de uma pequena família de receptores FPR (FPR1, FPR2 e FPR3), que são expressos por vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais. AnxA1 e os peptídeos derivados da sua porção N-terminal competem com lipoxina A<sub>4</sub> e a proteína amilóide sérica A pelo sítio ativo de FPR2. Curiosamente, já foi demonstrado *in vitro* que os peptídeos ativos de AnxA1 ativam todos os três receptores da família FPR. No entanto a relevância biológica deste achado ainda não está clara já que fragmentos bioativos de AnxA1 ainda não foram encontrados *in vivo* (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009).

Vários estudos já demonstraram que os glicocorticóides (endógeno e exógeno) induzem a expressão de AnxA1. A transcrição do gene que codifica a AnxA1 é regulada por dois sistemas, o constitutivo e o indutível. O sistema constitutivo está relacionado com a manutenção da expressão basal da AnxA1, através da região de regulação constitutiva, que é importante para iniciar o processo de transcrição. Já o sistema de regulação indutível é bastante complexo. Estudos da região promotora do gene da AnxA1 indicam que este gene contém elementos de resposta aos GCs (GRE) o que poderia explicar o aumento da síntese de AnxA1 em resposta a GCs (PEERS *et al.*, 1993; SOLITO *et al.*, 1998). Vários trabalhos demonstram que a síntese de AnxA1 induzida pelos GCs é mediada por mecanismos que dependem da ligação do complexo GC-GCR ao DNA, com conseqüente aumento da transcrição do gene que codifica a AnxA1 (PEERS *et al.*, 1993; SUAREZ *et al.*, 1993; PERRETTI e FLOWER, 1996). No entanto, o envolvimento dos GREs presentes no promotor do gene que codifica a AnxA1 na sua síntese induzida por GCs, é ainda discutível (SOLITO *et al.*, 1998). Outros estudos demonstram que a regulação da transcrição do gene da AnxA1 pelos GCs pode envolver mecanismos moleculares alternativos. Em alguns casos, os GCs podem ativar direta ou indiretamente outros fatores de transcrição, como o CREB (*cAMP responsive element-binding protein*) e o NFIL-6 (*nuclear factor-IL-6*). Na ativação indireta, o promotor de AnxA1 parece não ter um receptor canônico de GCs, mas contém um sítio consenso de ligação parcial que medeia a capacidade de resposta a IL-6, o que sugere que os GCs regulam a expressão de AnxA1 indiretamente através de IL-6 (SOLITO *et al.*, 1998; ANTONICELLI *et al.*, 2001). Deste modo, mais estudos devem ser realizados a fim de se descobrir os mecanismos pelos quais os GCs regulam expressão de AnxA1, já que esse processo ainda não está bem definido.

### 1.3.3 - Funções da AnxA1

A proteína AnxA1 é considerada a principal mediadora da ação anti-inflamatória dos hormônios GCs endógenos e exógeno. AnxA1 foi descrita inicialmente como a proteína responsável pela inibição da atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2), após o tratamento de células com GCs (FLOWER e BLACKWELL, 1979). A inibição da atividade da PLA2 constitui um mecanismo anti-inflamatório importante, pois tem como consequência inibição do ácido araquidônico e consequentemente, de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária (KIM *et al.*, 2001).

Acredita-se que o principal mecanismo do efeito anti-inflamatório da AnxA1 esteja relacionado com a inibição da transmigração dos leucócitos. Esse efeito está relacionado tanto à AnxA1 quanto aos peptídeos sintéticos gerados a partir da porção N-terminal desta proteína, particularmente o Ac2-26 (HAYHOE *et al.*, 2006). Vários estudos em modelos de inflamação aguda, crônica, ou mesmo sistêmica, demonstraram que a proteína AnxA1 é inibidora do extravasamento de leucócitos para o local da inflamação (YANG *et al.*, 2004; DAMAZO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007; PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009). Estudos evidenciam que o provável mecanismo de ação da AnxA1 na regulação da migração celular está relacionado com inibição da atividade das moléculas de adesão nas interações leucócito-endotélio, principalmente as integrinas e selectinas (SOLITO *et al.*, 2000). AnxA1 também está envolvida com a inibição da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da enzima sintase do óxido nítrico (iNOS), além de estar relacionada com a liberação de IL-10 em fagócitos, com a indução da apoptose de células inflamatórias *in vitro* e a remoção de células e corpos apoptóticos (Figura 5) (PARENTE e SOLITO, 2004).



**Figura 5. Efeito dos glicocorticóides, AnxA1, e seus peptídeos bioativos no tráfego de leucócitos durante a resposta inflamatória.** Várias das funções desencadeadas pelos GCs são compartilhadas pela AnxA1, dentre estas destacam-se redução da transmigração de neutrófilos e o aumento da fagocitose de células apoptóticas.

Adaptado de PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009.

#### 1.4 - Apoptose

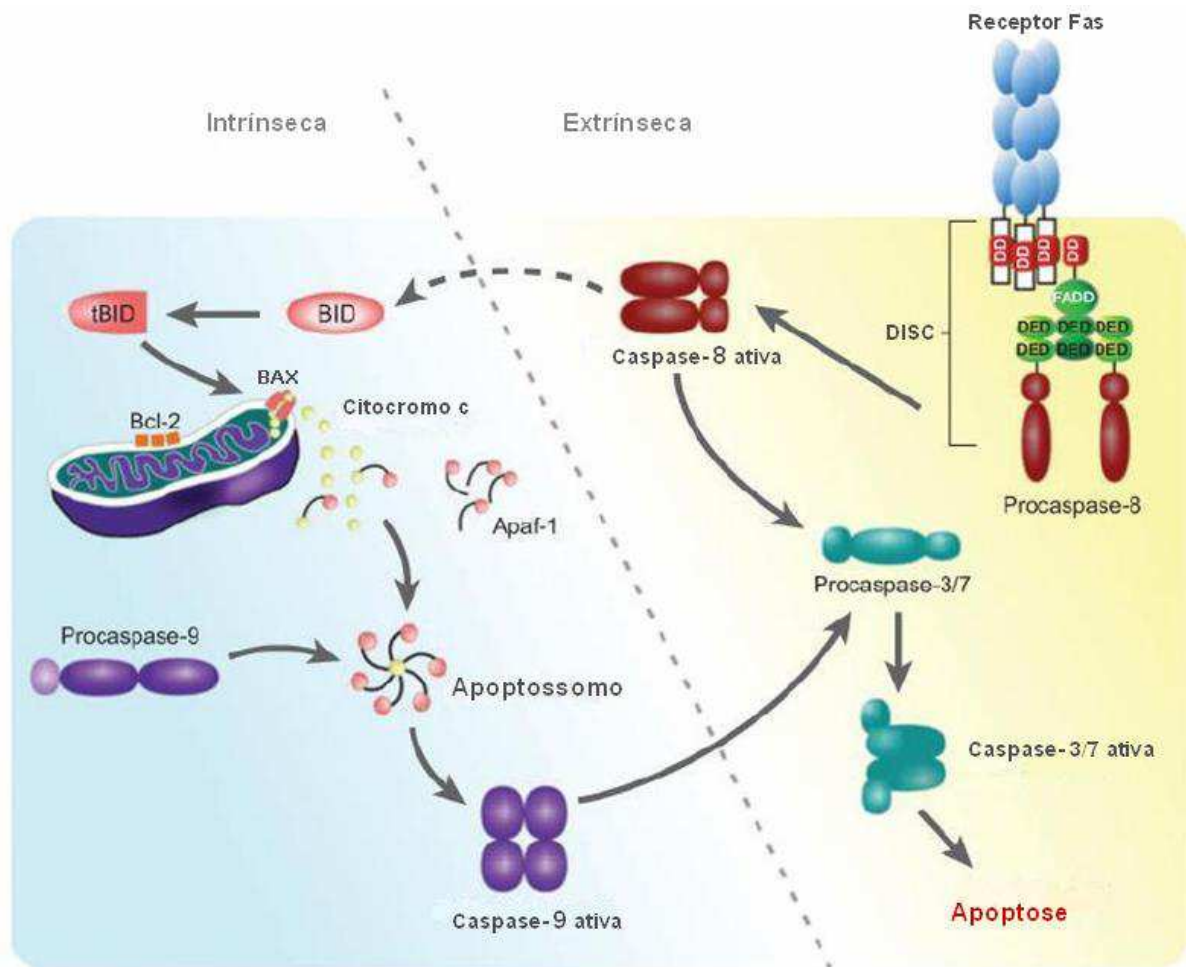
Apoptose ou morte celular programada é uma via genética bem conservada evolutivamente. Essa forma de morte das células é essencial para a homeostase tecidual e para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares. Defeitos no controle dessa via são implicados em várias desordens desde câncer e doenças auto-imunes às síndromes degenerativas (CORY e ADAMS, 2002). A apoptose é caracterizada por eventos morfológicos e bioquímicos específicos, incluindo retração da célula, vacuolização do

citoplasma, formação de bolhas na membrana citoplasmática, perda de aderência com a matriz extracelular, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo associada com clivagem do DNA (COHEN, 1993). Uma característica marcante é a exposição da fosfatidilserina, um fosfolipídio que em células viáveis é exclusivamente localizado no folheto interno da membrana plasmática e durante a apoptose é evertido para superfície externa da membrana (FADOK *et al.*, 1992). A célula também sofre um processo chamado *blebbing* (brotamento), com conseqüente formação de corpos apoptóticos (pequenas vesículas que transportam o conteúdo celular). As células e corpos apoptóticos são reconhecidos, fagocitados e degradados pelas células vizinhas ou fagócitos profissionais (SAVILL e FADOK, 2000). Assim, nenhuma proteína intracelular ou metabólitos são libertados para o tecido circundante.

O sinal para apoptose pode ser desencadeado por proteínas extracelulares (via extrínseca) ou intracelulares (via mitocondrial ou intrínseca) que em última instância culmina na ativação de proteases chamadas caspases as quais atuam clivando estruturas celulares e promovendo a decomposição celular (Figura 6). Muitos agentes induzem a apoptose das células alvo através da ativação da via apoptótica mitocôndria-dependente da família Bcl-2. Esta família de proteínas citoplasmáticas é caracterizada pela presença de membros que suprimem a apoptose (Ex: Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, A1) ou promovem apoptose (Ex: Bax, Bak, Bik, Bad, Bid, Bim e Puma) (CORY e ADAMS, 2002). A apoptose de neutrófilos seguida pela subseqüente remoção por fagócitos é um processo essencial na resolução inflamatória (FOX *et al.*, 2010, HALLET *et al.*, 2008, ROSSI, *et al.*, 2007, SOUSA *et al.*, 2009 e 2010).

Os neutrófilos expressam constitutivamente os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, incluindo Bax, Bad, Bak, Bid e Bik. Estas proteínas têm meia-vida relativamente longa e seus níveis celulares mudam pouco durante a exposição a agentes que aceleram ou retardam a apoptose de neutrófilos. Os neutrófilos humanos também expressam proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 e A1, e em grau menor Bcl-xL, mas não expressam Bcl-2. Mcl-1 e, em menor grau A1, são particularmente importantes para a sobrevivência do neutrófilo em resposta a estímulos pró-inflamatórios (MILOT e FILEP, 2011).





**Figura 6. Vias de sinalização da apoptose.** A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas vias distintas: a via intrínseca (mitocondrial) e a via extrínseca (citoplasmática). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular. Os sinais que são transduzidos convergem principalmente para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação do citocromo c. Esse processo é desencadeado por elevações nos níveis de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como Bax ou Bak. No citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e caspase-9, chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, o qual ativa caspase-3/7. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com proteínas adaptadoras como a FADD. Essas moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3/7, executando a morte por apoptose. DISC = complexo de sinalização indutor de morte.

Adaptado de BEST, 2008.

#### **1.4.1 - Evidências da participação de AnxA1 na apoptose de leucócitos**

Alguns estudos *in vitro* têm mostrado a correlação entre AnxA1 e apoptose de leucócitos (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009). Solito e colaboradores (2001) mostraram que a superexpressão de AnxA1 em células monocíticas U937 induziu a apoptose espontânea dessas células e esse processo foi associado com a ativação de caspase-3. Também foi demonstrado que AnxA1 exógena aumentou transitoriamente as concentrações de cálcio intracelular acompanhado da desfosforilação da proteína pró-apoptótica Bad e apoptose de neutrófilos humanos (SOLITO *et al.*, 2003). Sugere-se que, após um aumento de cálcio citosólico, a fosfatase ativada calcineurina desfosforila Bad, permitindo sua associação com a mitocôndria, formando um heterodímero com Bcl-xL e promovendo a apoptose (WANG *et al.*, 1999). Estas evidências experimentais sugerem que AnxA1 pode mediar os efeitos pró-apoptóticos dos glicocorticóides em algumas células, ativando caspase-3 e alterando fluxos de cálcio. Alguns estudos também correlacionam AnxA1 com o *clearance* de células e corpos apoptóticos. De acordo com Scannell e colaboradores (2007) AnxA1 endógena é liberada de neutrófilos apoptóticos e age sobre macrófagos promovendo a fagocitose e remoção das células apoptóticas. Outro estudo mostrou que macrófagos tratados com glicocorticóides secretam AnxA1, agindo de forma autócrina ou parácrina aumentando a fagocitose de neutrófilos apoptóticos (MADERNA *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que AnxA1 liberada de células necróticas podem atuar em macrófagos promovendo a eferocitose de neutrófilos apoptóticos (BLUME *et al.*, 2012).

#### **1.5 - Vias de sinalização envolvidas com sobrevivência celular**

A sinalização celular ocorre por meio de moléculas que formam redes altamente interativas, que coordenam as atividades e funções da célula. Uma das vias de sinalização envolvidas com a manutenção da sobrevivência celular está relacionada com a ativação do Fator Nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição considerado um mediador intracelular crítico da resposta inflamatória. NF- $\kappa$ B constitui uma família de fatores de transcrição que contém as proteínas p65/RelA, c-Rel, Rel B, p50/NF- $\kappa$ B1 e p52/NF- $\kappa$ B2 em várias combinações para formar o dímero transcricionalmente ativo, induzindo a ativação de vários genes envolvidos na resposta inflamatória e imune. Em condições de repouso, NF- $\kappa$ B fica seqüestrado no citoplasma ligado não covalentemente a proteínas inibitórias conhecidas como I $\kappa$ B. Após a estimulação com agonistas apropriados, I $\kappa$ B é fosforilado e NF- $\kappa$ B é então

liberado e translocado para o núcleo, iniciando a ativação de genes. Dentre estes, incluem-se os da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), e quimiocinas (IL-8) (LAWRENCE, 2009). Alguns trabalhos já evidenciaram a importância de NF- $\kappa$ B na regulação da sobrevivência de granulócitos *in vitro* (WARD, 2004; ROSSI *et al.*, 2007). Nosso grupo de pesquisa também já demonstrou em trabalhos *in vivo* que a inibição de NF- $\kappa$ B pode ser importante para a resolução da inflamação. Lopes e colaboradores (2011) mostraram em um modelo de artrite, que o bloqueio de NF- $\kappa$ B resultou na apoptose de neutrófilos e na resolução da inflamação neutrofílica. Também já foi demonstrado que a administração de rolipram, um inibidor de PDE4, promoveu a apoptose de eosinófilos e resolução da inflamação, associado a uma diminuição dos níveis de NF- $\kappa$ B. No entanto, apesar do rolipram promover a inibição da ativação de NF- $\kappa$ B, esta via não parece ser relevante na indução da resolução neutrofílica, já que o uso de inibidores de NF- $\kappa$ B não induziram a resolução. Em contrapartida, Lawrence e colaboradores (2001) mostraram que a inibição de NF- $\kappa$ B atrasa a resolução e impede a apoptose em um modelo de pleurisia induzida por carragenina. Portanto, as evidências experimentais sugerem que NF- $\kappa$ B possa ter um comportamento mútuo na regulação da sobrevivência celular, já que este fator de transcrição está envolvido com a ativação ou supressão de vários genes pró-inflamatórios (LAWRENCE e FONG, 2010).

Outra importante via de sinalização relacionada com a manutenção da sobrevivência celular está associado com a ativação das MAPKs (Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos) dentre elas: ERK1/2, p38 e JNK. As MAPKs são uma família de proteínas sinalizadoras envolvidas com a diferenciação celular, resposta a estresse, apoptose e inflamação. As MAPKs são ativadas em cascata, sendo que pelo menos três enzimas são ativadas em série: uma MAPK cinase cinase (MAPKKK), uma MAPK cinase (MAPKK) e uma MAP cinase (MAPK) (ZHANG e LIU, 2002; JUNTILA *et al.*, 2008). Já foi demonstrado em um modelo de inflamação aguda que a inibição da via de ERK1/2 é importante para a resolução da inflamação neutrofílica (SAWATZKY *et al.*, 2006).

A regulação da proliferação e sobrevivência celular em um organismo multicelular é um processo complexo, que envolve a regulação de fatores de crescimento fornecidos pelo micro ambiente (células circundantes). Tanto a via de NF- $\kappa$ B quanto das MAPKs envolvem a indução de uma cascata de sinalização intracelular, desempenhando um papel crítico na regulação da sobrevivência celular.

## 2 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Um dos grandes desafios no controle do processo inflamatório é permitir um eficiente recrutamento de células com um mínimo de dano para o tecido, uma vez que os mediadores derivados dos grânulos de leucócitos podem levar à lesão tecidual e disfunção do órgão. Após a eliminação do agente causador da lesão é importante que as células e mediadores presentes no local da lesão também sejam excluídos restabelecendo a integridade do tecido lesado. Assim, existe um grande interesse em entender os mecanismos responsáveis pela eliminação dessas células, inativação dos mediadores secretados no sítio inflamatório bem como a ativação de moléculas com propriedades pró-resolutivas.

Nosso grupo de pesquisa têm se dedicado ao estudo de vias de sinalização e mediadores importantes para a resolução da resposta inflamatória. Recentemente, foi demonstrado que o aumento do AMP cíclico, promovido pelo tratamento com Rolipram (inibidor de PDE-4), promove a resolução da resposta inflamatória pela indução de apoptose tanto de eosinófilos (SOUSA *et al.*, 2009) quanto de neutrófilos (SOUSA *et al.*, 2010). O mecanismo pelo qual rolipram induziu apoptose destes granulócitos foi dependente da ativação de caspases e da inibição de algumas vias de sinalização importantes para a sobrevivência celular.

A proteína AnxA1 possui efeitos modulatórios sobre a inflamação sendo mediadora de vários dos efeitos anti-inflamatórios dos GCs. Até o momento, existem poucos estudos que correlacionaram AnxA1 com apoptose de leucócitos. Além disso, esses ensaios foram realizados *in vitro* e requerem validação em modelos experimentais de inflamação. Assim, tivemos o interesse em investigar a dinâmica de expressão dessa proteína durante o processo de resolução da resposta inflamatória e seu impacto sobre a apoptose de neutrófilos, utilizando um modelo experimental de inflamação aguda.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral:**

Estudar o papel da proteína induzida por glicocorticóides AnxA1, durante a resolução inflamatória espontânea e induzida por fármacos no decurso da pleurisia induzida por LPS em camundongos.

#### **3.2 - Objetivos específicos:**

**3.2.1** - Caracterizar o modelo de pleurisia induzida por LPS, o qual resolve espontaneamente, quanto à: a cinética de acumulação de leucócitos, presença de células apoptóticas, proteínas envolvidas com apoptose (caspase-3 clivada, Bax) e proteínas envolvidas com sobrevivência celular (P-ERK1/2, P-I $\kappa$ B- $\alpha$ ).

**3.2.2** - Verificar a cinética de expressão da proteína AnxA1 através de ensaio de western blot, utilizando extratos protéicos de células obtidas do lavado pleural de animais desafiados com LPS.

**3.2.3** - Avaliar o efeito de drogas, que foram previamente demonstradas promoverem a resolução inflamatória no modelo de pleurisia induzida por LPS, na expressão de AnxA1 e de vias relacionadas à sobrevivência celular e apoptose. A saber: Rolipram (inibidor de fosfodiesterase-4), wortmannin (inibidor de PI3K) e Dexametasona (glicocorticóide sintético).

**3.2.4** - Investigar o papel de AnxA1 na resolução inflamatória natural e induzida por dexametasona, através da inibição de AnxA1, utilizando um inibidor inespecífico do receptor onde AnxA1 atua (FPR2) ou anticorpo anti-AnxA1.

**3.2.5** - Verificar o papel de AnxA1 na resolução da inflamação e na apoptose de neutrófilos através da administração do peptídeo sintético Ac2-26 que se refere à parte N-terminal da proteína AnxA1 e que possui atividade biológica comparada à proteína total.

## **4 - MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 - Modelo murino de pleurisia induzido por LPS**

Todos os procedimentos descritos neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolos números: 148/2006 e 15/2011). Camundongos BALB/c de 8–10 semanas de idade foram adquiridos do centro de Bioterismo do Instituto de ciências Biológicas da UFMG e mantidos em condições padronizadas tendo livre acesso à água e ração. Para avaliação da cinética de migração de neutrófilos para a cavidade pleural, os camundongos foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo (4, 8, 24, 48 e 72 horas) após o desafio com 250ng de LPS ou solução salina. Posteriormente, as células foram recuperadas da cavidade pleural, lavando-se esta cavidade 2 vezes com 2mL de PBS contendo EDTA (1mM). A escolha da dose de LPS foi determinada previamente em nosso laboratório (SOUSA *et al.*, 2010).

### **4.2 - Processamento das células**

#### **4.2.1 - Contagem total e diferencial de células**

As células da cavidade pleural foram centrifugadas a 1.200 r.p.m. por 5 minutos a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i) e o sedimento celular ressuspenso em 100µL de BSA 3% em PBS. Uma alíquota das células foi diluída 10 vezes na solução de lise de hemácias (Solução de Turk - IMBRALAB) para a realização da contagem total de células utilizando câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, as células foram cito-centrifugadas utilizando preparações em lâminas de *citospin* (Shandon III) com as células ressuspenso em albumina, de forma que a lâmina contivesse aproximadamente 50 mil células. As lâminas foram coradas com o método de *May-Grunwald-Giemsa* utilizando o kit Panótico Rápido (*LB Laborclin*), para a realização da contagem diferencial de células no aumento de 100 vezes no microscópio ótico. As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

#### **4.2.2 - Obtenção dos extratos celulares**

Células recuperadas da cavidade pleural foram lisadas pela adição de 500 µL de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de NaVO<sub>3</sub>, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 12.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i), sendo o sobrenadante aliquoteado e guardado à -20°C até o momento de uso.

#### **4.2.3 - Dosagem de proteínas totais no lavado pleural**

Para realizar a dosagem de proteínas totais das células recolhidas pelo lavado pleural, foi utilizado o kit *Bio-Rad Protein Assay* (*Bio-Rad Laboratories*) baseado no método de Bradford. O ensaio é realizado em uma microplaca de 96 poços (NUNC), e consiste na adição de 2 µL de cada amostra a 200 µL do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente é realizado uma curva padrão utilizando como solução padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) a 595 nm. A absorbância das amostras é comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados são expressos em mg/mL.

#### **4.2.4 - Western Blot para análise da expressão de AnxA1 e da ativação de vias sinalizadoras intracelulares**

Os extratos protéicos totais (50 µg) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão (10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos protéicos foram fracionados em gel de 10-15% de poliacrilamida/SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose (*Hybond™ ECL™, GE Healthcare*). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com PBS-Tween, e incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C por uma noite. Os anticorpos utilizados no presente projeto foram anti-Anexina A1 (*Santa Cruz Biotechnology*), anti-Bax, anti-caspase-3 clivada, anti-Mcl-1 e anti as formas fosforiladas das proteínas IκB-α e ERK1/2 (*Cell Signaling*

*Technology*) e anti- $\beta$ actina (*Sigma-Aldrich*). Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário respectivo ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora *ECL-Plus* (*GE Healthcare*), expostas contra filme de raio X (*Hyperfilm ECL, GE Healthcare*) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante.

### **4.3 - Tratamentos**

#### ***4.3.1 - Tratamento com fármacos que induzem a resolução da resposta inflamatória***

O papel de ANXA1 na resolução inflamatória induzida por fármacos foi investigado utilizando-se anti-inflamatórios que foram previamente demonstrado participar da resolução da inflamação neutrofílica (SOUSA *et al.*, 2010). A saber: Rolipram, inibidor de fosfodiesterase 4 (*Biomol, Plymouth Meeting, PA*); wortmannin, inibidor de PI3K (*Calbiochem*); Dexametasona, glicocorticóide sintético (*Sigma-Aldrich*). Nos grupos tratados com rolipram, foram administrados 6mg/kg da droga diluída em 2% de DMSO e 98% de PBS estéril, via intraperitoneal (i.p.). O volume total administrado por animal foi de 200  $\mu$ L. Nos grupos tratados com wortmannin, foram administrados 1mg/kg da droga diluída em PBS estéril, via intrapleurar (i.pl.). O volume total administrado por animal foi de 100  $\mu$ L. Nos grupos tratados com Dexametasona, os animais foram tratados com 2mg/kg da droga diluída em PBS estéril, via intraperitoneal. O volume total administrado por animal foi de 200  $\mu$ L. Estes agentes foram administrados 4h após o desafio com LPS, ou seja, permitimos o recrutamento das células e fizemos o tratamento após o estabelecimento da resposta inflamatória (4h LPS + 4h tratamento). Portanto, após 8h do desafio, foi realizado o lavado pleural para contagem total e diferencial de células.

#### ***4.3.2 - Tratamento com anti-AnxA1 ou com antagonista inespecífico do receptor de AnxA1***

Investigamos se a inibição de AnxA1 reverte a resolução inflamatória natural e induzida pro drogas. Para atingirmos este objetivo utilizamos o peptídeo Boc-1 (*Sigma-Aldrich*), antagonista inespecífico do receptor FPR2/ALXR ou anti-soro de ovelha anti-AnxA1. O anti-AnxA1 foi cedido pelo Dr. Steve Poole (*Biotherapeutics Group, National Institute for Biological Standards and Control, Londres, Inglaterra*). Nos animais tratados com Boc-1, foram administrados 2.0 mg/kg, 100  $\mu$ L via intravenosa. O anti-AnxA1 foi diluído na proporção 1:1 em PBS e administrado 200  $\mu$ L via intraperitoneal.



Na resolução natural, Boc-1 e anti-AnxA1 foram administrados 24h e 36h após desafio com LPS com lavado pleural realizado em 48h. Na resolução induzida, 4h após o desafio com LPS, os camundongos foram tratados com dexametasona, sendo feito tratamento prévio com Boc-1 ou anti-AnxA1, 15 minutos antes da dexametasona. Após 8h do desafio, foi realizado o lavado pleural para contagem total e diferencial de células. Como controle para anti-AnxA1 animais foram injetados com soro não imune de ovelha.

#### **4.3.3 - Tratamento com peptídeo Ac2-26**

Para avaliar o papel da AnxA1 no processo de resolução induzida, utilizamos o peptídeo sintético Ac2-26 que se refere à parte N-terminal da proteína AnxA1, possuindo atividade biológica comparada à proteína total. O peptídeo Ac2-26 foi diluído em PBS estéril e administrado 100µg pelas via intraperitoneal ou intrapleural. O peptídeo foi cedido pelo Dr. Mauro Perretti (*William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Londres, Inglaterra*). O tratamento com Ac2-26 foi realizado 4h após desafio com LPS e o lavado pleural realizado 8h ou 24 h após desafio para contagem total e diferencial de células.

#### **4.3.4 - Tratamento com zVAD-fmk**

O tratamento com o pan inibidor de caspases zVAD-fmk (*Tocris Bioscience*) foi realizado 15 minutos antes da administração de peptídeo Ac2-26. O zVAD-fmk foi diluído em 2% de DMSO e PBS estéril e administrado 1 mg/kg, via intraperitoneal. O volume total administrado por animal foi de 200 µL.

### **4.4 - Análise da apoptose de leucócitos**

A apoptose dos leucócitos presentes no lavado pleural dos animais desafiados com LPS, com ou sem os tratamentos especificados acima, foi avaliada morfológica e bioquimicamente.

*Caracterização morfológica da apoptose:* As células ( $5 \times 10^4$ ) recuperadas da cavidade pleural serão cito-centrifugadas, fixadas e coradas com *May-Grunwald-Giemsa* e contadas (500 células por lâmina) utilizando microscópio ótico para determinar a porcentagem de células com morfologia apoptótica.

*Caracterização bioquímica da apoptose:* Utilizamos análises de western blot para detecção de proteínas envolvidas com apoptose. Os lisados celulares foram obtidos como descrito anteriormente, sendo os *immunoblots* realizados com anticorpo que detecta a ativação de caspase-3 clivada e Bax.

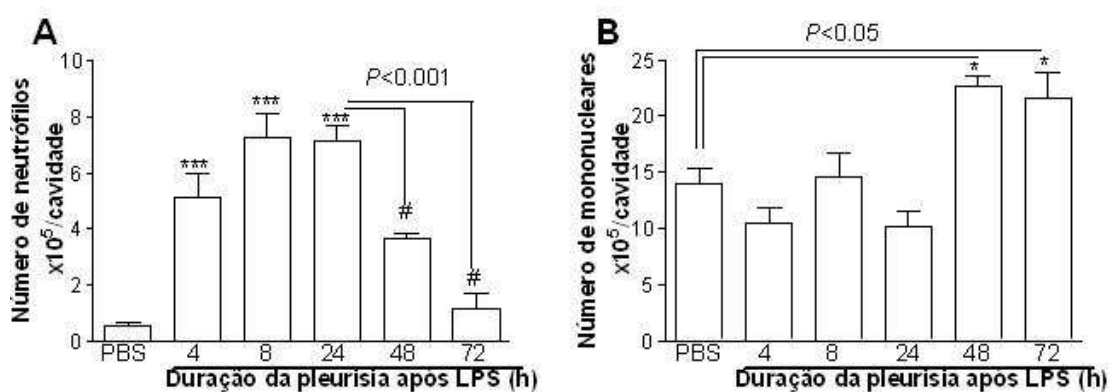
#### **4.5 - Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida do teste Newman-Keuls, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $P < 0.05$ . Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM (Erro padrão da média). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software GraphPad Prism 4.0*.

## 5 - RESULTADOS

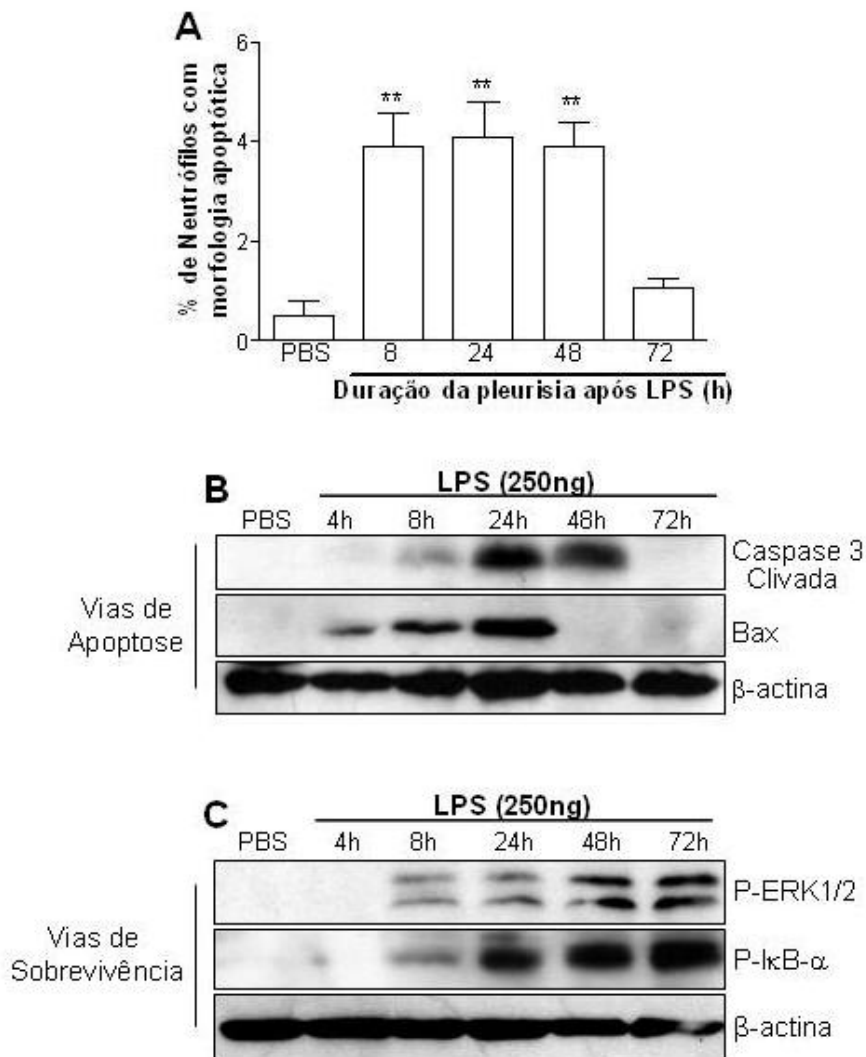
### 5.1 - A resolução natural da pleurisia induzida por LPS foi acompanhada da apoptose de neutrófilos

A injeção intrapleural de LPS induziu um influxo de neutrófilos para cavidade pleural que foi elevado em 4h atingindo um pico entre 8-24h. Os neutrófilos diminuíram em 48h, e a resolução total ocorreu em 72h (Figura 7A). A porcentagem de células mononucleares em camundongos injetados com PBS consistiu de 98-100%, enquanto que nos animais injetados com LPS, quantificada no período de 8-24h após a injeção, foram de 50-60% de neutrófilos e 40-50% de mononucleares. A figura 7B retrata os números absolutos de células, indicando que não houve aumento de células mononucleares no período de 8-24h após desafio com LPS. Posteriormente, houve um aumento importante dessas células na cavidade pleural que coincide com o período de resolução da inflamação neutrofílica (fase de 48-72h).



**Figura 7. Cinética do recrutamento celular durante a pleurisia induzida por LPS.** Camundongos foram injetados com PBS ou LPS (250 $\mu$ g/cavidade, i.pl.) e o número de neutrófilos (A), células mononucleares (B) foram avaliados em diferentes tempos. Resultados são expressos como número de células por cavidade e são mostrados com média  $\pm$  EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ , quando comparado com camundongo injetado com PBS e #,  $P < 0.001$ , quando comparado com animais desafiados com LPS 24h.

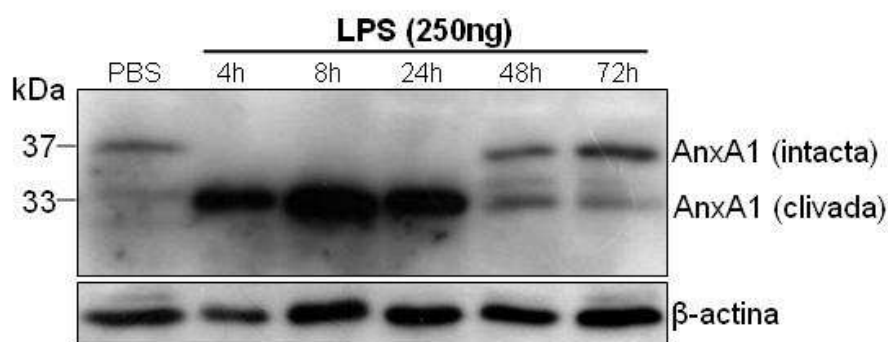
Após avaliar a cinética do recrutamento de neutrófilos e células mononucleares na cavidade pleural, observamos que a resolução espontânea da inflamação neutrofílica foi associada a um aumento no número de células apoptóticas, como visto nos tempos de 8-48h, tempos que precedem a resolução completa. A apoptose foi demonstrada por critérios morfológicos (Figura 8A) e por um aumento na acumulação de caspase-3 clivada e Bax (Figura 8B). Por outro lado, o perfil das proteínas relacionadas à sobrevivência celular, P-ERK1/2 e P-I $\kappa$ B $\alpha$  durante a pleurisia induzida por LPS é mostrado na Figura 8C. Essas proteínas relacionadas à sobrevivência celular são detectadas em correspondência com o recrutamento de neutrófilos, mas é observado um acentuado aumento na detecção associado com o recrutamento de células mononucleares na cavidade pleural (compare Figura 8C com 7 A e B).



**Figura 8. Cinética da apoptose de neutrófilos e expressão de vias de apoptose e sobrevivência celular durante a pleurisia induzida por LPS.** Camundongos foram injetados com PBS ou LPS (250ng/cavidade, i.pl.) e o número de células com morfologia apoptótica (A) foram avaliados em diferentes tempos. Resultados são expressos como % de neutrófilos com morfologia apoptótica e são mostrados como média  $\pm$  EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. \*\*,  $P < 0.01$ , quando comparado com camundongo injetado com PBS. (B e C), análise de western blot para caspase-3 clivada, Bax, P-ERK1/2 e P-I $\kappa$ B- $\alpha$ . Extratos celulares foram obtidos de células inflamatórias coletadas na cavidade pleural em vários tempos e processadas para western blot. Para controle, as membranas foram avaliadas com anti- $\beta$ -actina. *Blots* são representativos de três experimentos independentes em *pools* de células de pelo menos cinco animais.

## 5.2 - A resolução natural da pleurisia induzida por LPS foi acompanhada pelo aumento de AnxA1

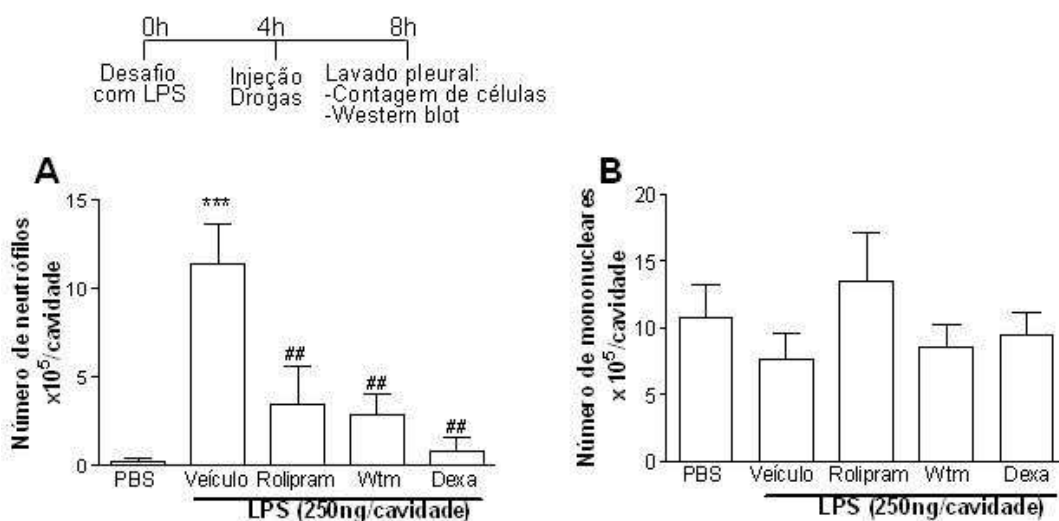
A proteína AnxA1 intacta (37 kDa) foi detectada em animais desafiados com PBS mas diminuiu acentuadamente durante a fase de recrutamento de neutrófilos (4-24h após injeção de LPS). Curiosamente, os níveis de AnxA1 intacta foram recuperados durante a fase de resolução da inflamação, nos tempos de 48-72h (Figura 9). De forma contrária, o produto de degradação de AnxA1 (33 kDa), foi mal detectado em camundongos injetados com PBS, fortemente detectado durante a fase de recrutamento de neutrófilos (4-24h) e detectado em baixos níveis durante a fase de resolução da inflamação (48-72h) (Figura 9).



**Figura 9. Cinética do acúmulo de AnxA1 durante a pleurisia induzida por LPS.** Camundongos BALB/c foram injetados com LPS (250ng/cavidade, i.pl.), as células inflamatórias foram coletadas da cavidade pleural em vários tempos e processadas para análise de western blot para detecção dos níveis de AnxA1. Para controle, as membranas foram avaliadas com anti-β-actina. *Blots* são representativos de três experimentos independentes em *pools* de células de pelo menos cinco animais.

### 5.3 - A resolução induzida por drogas anti-inflamatórias promove o acúmulo de AnxA1 associado com ativação de vias de apoptose e regulação de vias de sobrevivência celular

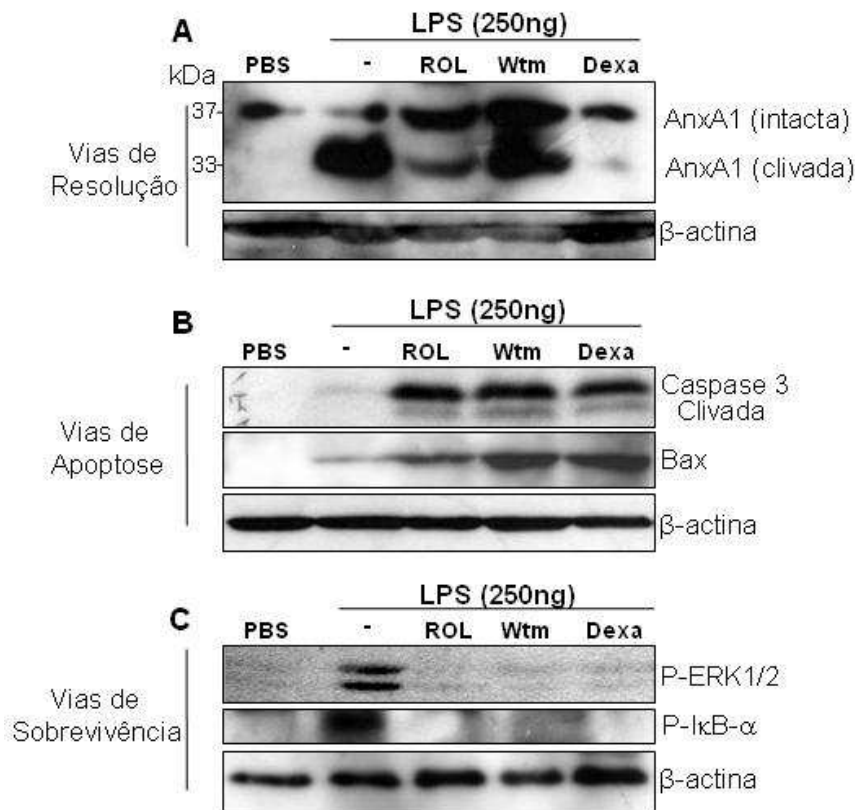
Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que o tratamento de camundongos com rolipram, um inibidor de PDE4, após o estabelecimento da inflamação, diminuiu o número de neutrófilos e aumentou eventos apoptóticos na cavidade pleural de uma maneira dependente de PI3K/Akt (SOUSA *et al.*, 2010). Assim, foi examinado neste trabalho o efeito de rolipram, wortmannin (um inibidor de PI3K/Akt) e dexametasona (um glicocorticoide sintético) na resolução da inflamação neutrofílica na cavidade pleural, e se estas drogas poderiam influenciar os níveis da proteína AnxA1. Observamos que o tratamento de camundongos com essas drogas anti-inflamatórias reduziu o número de neutrófilos na cavidade pleural (Figura 10A) sem alterar o número de células mononucleares (Figura 10B).



**Figura 10. Efeito de drogas anti-inflamatórias durante a pleurisia induzida por LPS.** Camundongos foram injetados com LPS (250ng/cavidade, i.pl.) ou PBS e 4h depois receberam uma injeção sistêmica de rolipram (6mg/kg, i.p.), dexametasona (2mg/kg, i.p.), wortmannin (1mg/kg, i.pl.) ou veículo. O número de neutrófilos (A) e células mononucleares (B) foram avaliados 4h após tratamento com as drogas, ou seja, 8h após desafio com LPS. Resultados são expressos como número de neutrófilos ou células mononucleares por cavidade e são mostrados como média  $\pm$  EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. \*\*\*,  $P < 0.001$  quando comparado com animais injetados com PBS e ##,  $P < 0.01$ , quando comparado com animais desafiados com LPS.

O efeito causado pelo tratamento com estas drogas foi acompanhado pelo aumento dos níveis de AnxA1 intacta (37 kDa) nos extratos inflamatórios (Figura 11A). De maneira interessante, o tratamento com as drogas reduziu a clivagem de AnxA1, como visto pela diminuição de AnxA1 clivada (33 kDa) quando comparado com LPS sozinho (Figura 11A e também nas Figuras 12C e 13C mostradas adiante).

Em seguida, avaliamos se o aumento nos níveis de AnxA1 intacta causado pelo tratamento com rolipram, wortmannin ou dexametasona estava associado com um aumento no número de células apoptóticas na cavidade pleural. Nós encontramos uma correlação positiva entre AnxA1 intacta e ativação de um programa pró-apoptótico, visto pela acumulação de Bax e clivagem de caspase-3 e inibição da fosforilação de ERK1/2 e I $\kappa$ B- $\alpha$  (Figuras 11B e 11C).



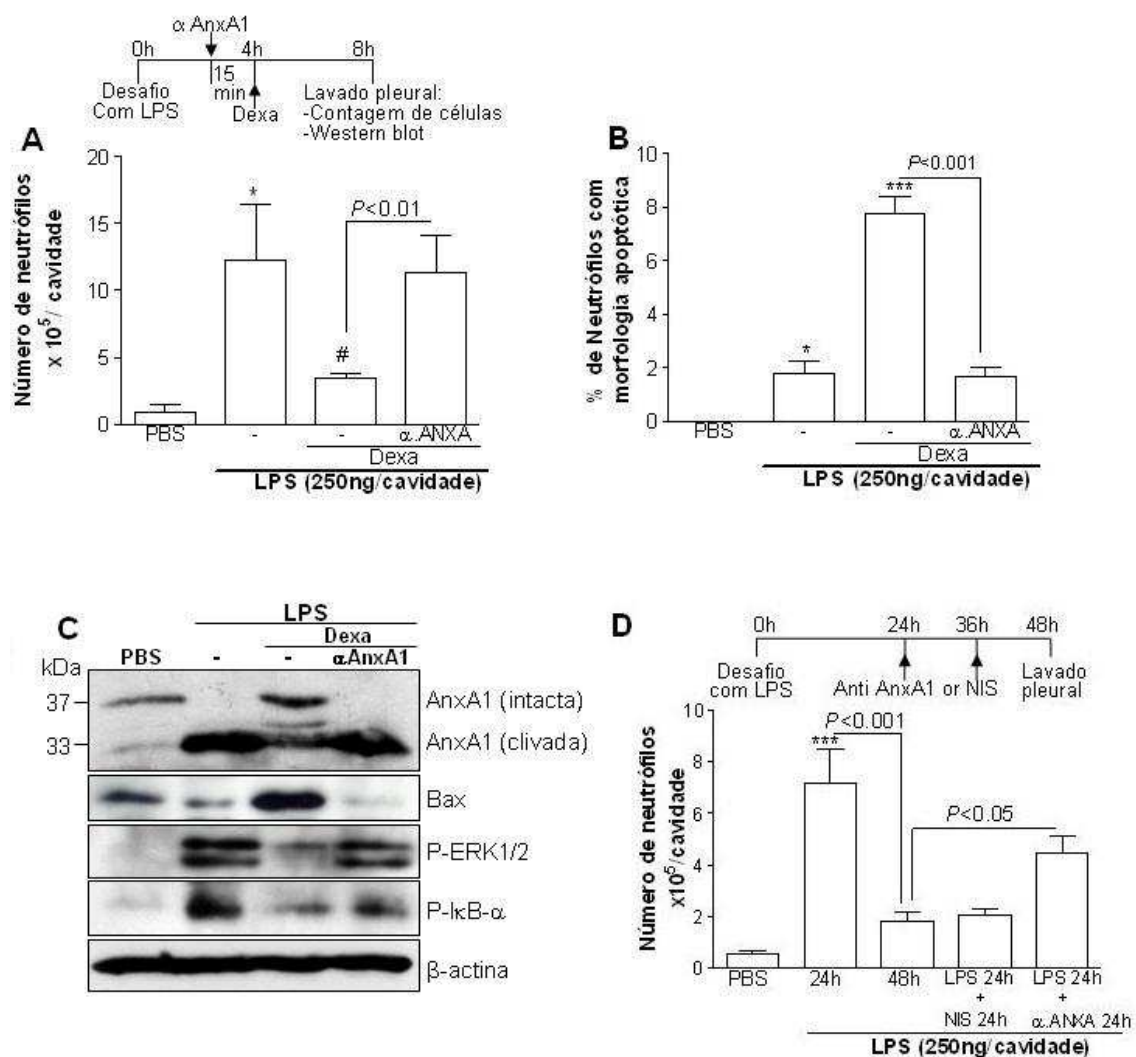
**Figura 11. Efeito do tratamento com drogas anti-inflamatórias nos níveis de AnxA1 e proteínas associadas com apoptose e sobrevivência celular.** O extrato proteico total das células coletadas da cavidade pleural 4h após tratamento com as drogas, ou seja, 8h após desafio com foi analisado por western blot para detecção de proteínas das vias de resolução (AnxA1) (A), apoptose (B) (caspase-3 clivada e Bax) e sobrevivência celular (B) (P-ERK1/2, P-I $\kappa$ B- $\alpha$ ). Para controle, as membranas foram avaliadas com anti- $\beta$ -actina. *Blots* são representativos de três experimentos independentes em *pools* de células de pelo menos cinco animais.



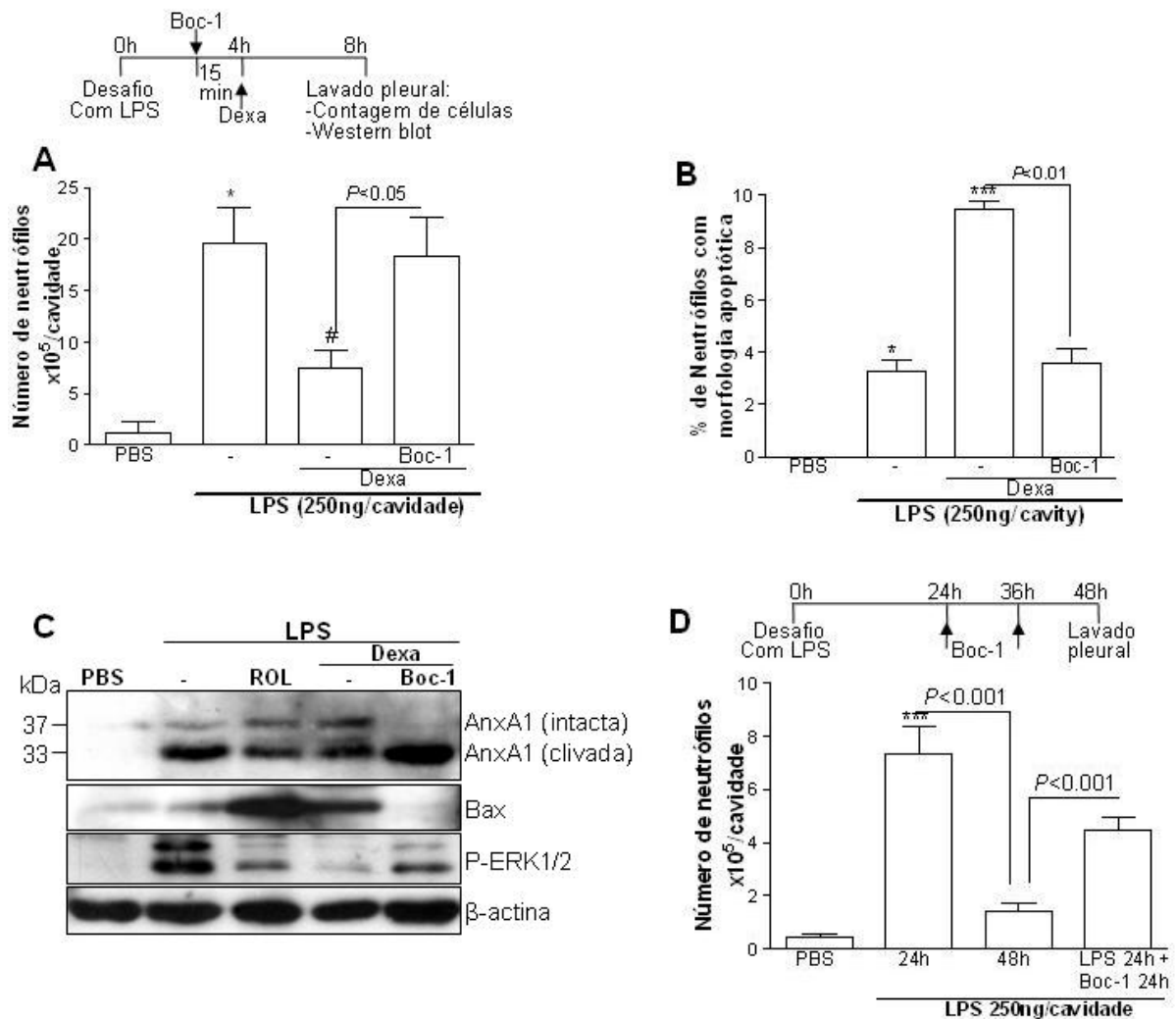
#### **5.4 - O bloqueio de AnxA1 previne a resolução natural e induzida por dexametasona**

A relevância funcional da AnxA1 produzida endogenamente, durante a resolução espontânea ou induzida por dexametasona, para a resolução da inflamação em nosso modelo experimental foi então investigada. Para tal, foram empregadas duas estratégias para bloquear AnxA1: um anticorpo específico que se liga à AnxA1 ou um antagonista não seletivo do receptor FPR/ALX (Boc-1). A administração de anti-AnxA1 (Figura 12) ou Boc-1 (Figura 13) impediu a resolução induzida por dexametasona (Figura 12A e 13A). Tais efeitos foram associados com a diminuição da expressão de AnxA1 intacta (Figuras 12C e 13C) e de eventos apoptóticos, como visto pela diminuição de Bax e neutrófilos com morfologia apoptótica nos exudatos pleurais (Figuras 12B, 12C, 13B e 13C). Além disso, o tratamento com anti-AnxA1 preveniu a diminuição da fosforilação de P-ERK1/2 e P-I $\kappa$ B $\alpha$  induzida por dexametasona (Figura 12C) e o tratamento com Boc-1 produziu efeitos similares aos encontrados com o anti-AnxA1 (Figura 13C e dado não apresentado para P-I $\kappa$ B $\alpha$ ). De forma interessante, o tratamento dos camundongos com rolipram e dexametasona também diminuiu a clivagem de AnxA1 (Figuras 12C e 13C).

Nós também analisamos os efeitos de anti-AnxA1 e Boc-1 na resolução espontânea da pleurisia induzida por LPS. Uma vez que o aumento de AnxA1 durante a resolução natural se dava a partir do tempo de 48h, pensamos em prevenir este aumento utilizando as duas estratégias de inibição citadas acima, em tempos anteriores ao de detecção da proteína, e se estas impactariam na resolução. Assim, o tratamento dos animais foi realizado após 24h do desafio com LPS e perdurou por 24 horas (foram dadas duas doses de ambos os tratamentos em intervalos de 12h). Nossos resultados, apresentados nas Figuras 12D e 13D, mostram que ambas as estratégias de inibição de AnxA1 impediram a resolução que acontece naturalmente após 48h do desafio com LPS, sugerindo que AnxA1 produzida endogenamente é parte de um programa pró-resolutivo fisiológico. De forma importante, o tratamento com soro não imune de ovelha (NIS) não teve efeito na resolução da inflamação (Figura 12D).



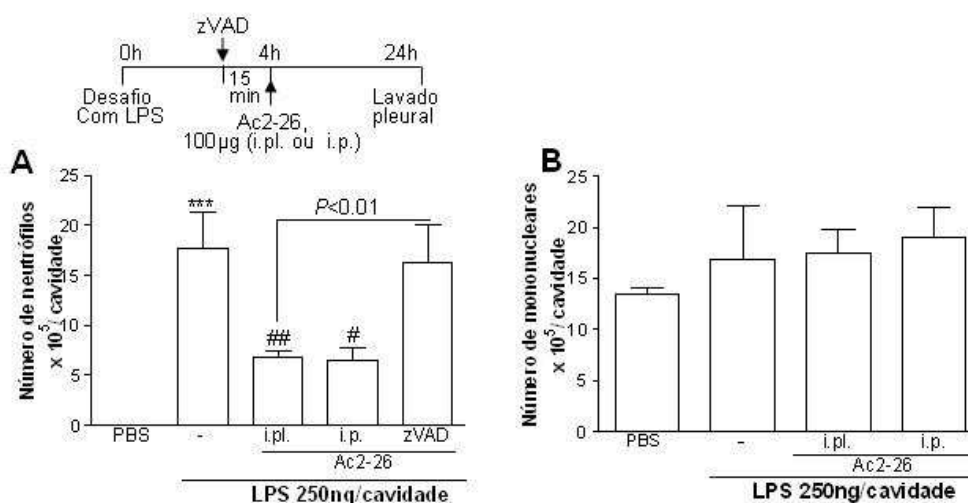
**Figura 12. Efeito do tratamento com anticorpo anti-AnxA1 na resolução da inflamação aguda natural e induzida por dexametasona.** Camundongos foram injetados com LPS (250ng/cavidade, i.pl.) ou PBS e 4h depois receberam uma injeção sistêmica de dexametasona (2mg/kg, i.p.) ou uma injeção do anticorpo anti-AnxA1 (200μL, i.p.) 15 minutos antes da dexametasona. Número de neutrófilos (A), células com morfologia apoptótica (B), e western blot para AnxA1, Bax, P-ERK and P-IκB-α (C) foram avaliadas 4h após tratamento com a droga, ou seja, 8h após desafio com LPS. Em outro experimento, tratamos animais desafiados com LPS 24h com anti-AnxA1 (200μL, i.p., duas administrações em intervalos de 12h). As células foram coletadas da cavidade pleural após 24h, ou seja, 48h após desafio com LPS e processadas para contagem de neutrófilos (D). Resultados são expressos como número de neutrófilos por cavidade ou porcentagem de neutrófilos com morfologia apoptótica e são mostrados como média ± EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. \*, P < 0.05 e \*\*\*, P < 0.001 quando comparado com animais injetados com PBS e #, P < 0.05 quando comparado com animais desafiados com LPS. Blots são representativos de três experimentos independentes em pools de células de pelo menos cinco animais. Para controle, as membranas foram avaliadas com anti-β-actina. NIS= soro não imune de ovelha.



**Figura 13. Efeito do tratamento com Boc-1, um antagonista do receptor FPR/ALXR na resolução da inflamação aguda natural e induzida por dexametasona.** Camundongos foram injetados com LPS (250ng/cavidade, i.pl.) ou PBS e 4h depois receberam uma injeção sistêmica de dexametasona (2mg/kg, i.p.) ou uma injeção do Boc-1 (2mg/kg, i.v.) 15 minutos antes da dexametasona. Número de neutrófilos (A), células com morfologia apoptótica (B), e western blot para AnxA1, Bax, P-ERK and P-I $\kappa$ B- $\alpha$  (C) foram avaliadas 4h após tratamento com a droga, ou seja, 8h após desafio com LPS. Em outro experimento, tratamos animais desafiados com LPS 24h com Boc-1 (2mg/kg, i.v., duas administrações em intervalos de 12h). As células foram coletadas da cavidade pleural após 24h (ou seja, 48h após desafio com LPS) e processadas para contagem de neutrófilos (D). Resultados são expressos como número de neutrófilos por cavidade ou porcentagem de neutrófilos com morfologia apoptótica e são mostrados como média  $\pm$  EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. \*,  $P < 0.05$  ou \*\*\*,  $P < 0.001$  quando comparado com animais injetados com PBS e #,  $P < 0.05$  ou \*\*\*,  $P < 0.001$ , quando comparado com animais tratados com veículo ou animais desafiados com LPS 24h, respectivamente. Blots são representativos de três experimentos independentes em pools de células de pelo menos cinco animais. Para controle, as membranas foram avaliadas com anti- $\beta$ -actina.

### 5.5 - Administração de Ac2-26, um peptídeo sintético da porção N-terminal de AnxA1, promove a resolução da inflamação através da indução da apoptose de neutrófilos

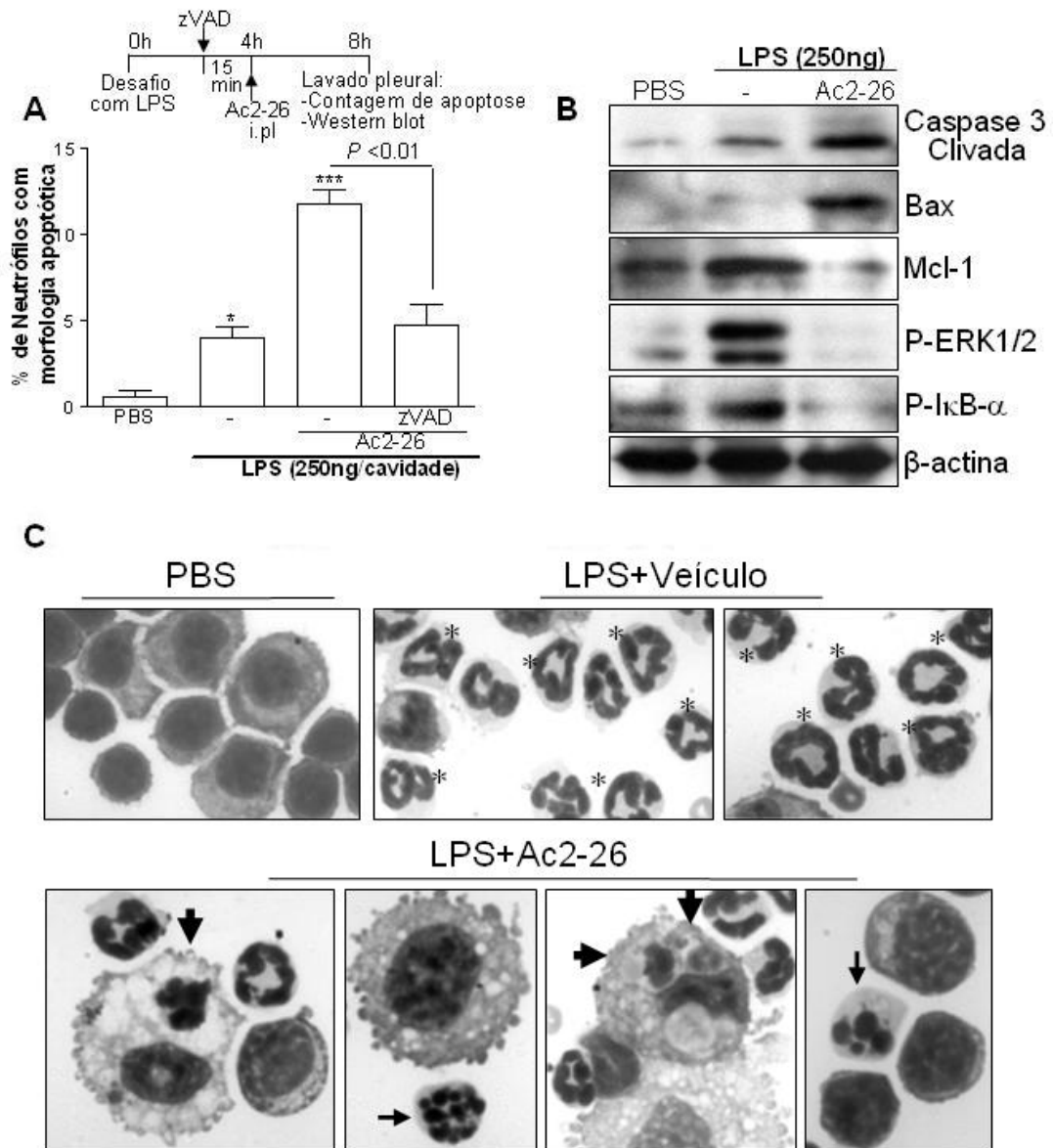
Os dados obtidos até o momento indicam que os níveis de AnxA1 estão aumentados durante a resolução natural e induzida por drogas (Figuras 9 e 11) e estratégias que inibam AnxA1 previnem a resolução da inflamação pela diminuição de eventos apoptóticos na cavidade pleural mediados por AnxA1 (Figuras 12 e 13). Posteriormente, nós avaliamos o efeito da administração de AnxA1 exógena no decurso da pleurisia induzida por LPS. Para este fim, tratamos os animais com o peptídeo Ac2-26 (100µg/cavidade), que contém a porção N-terminal ativa de AnxA1. Observamos que nos animais desafiados com LPS e tratados com o peptídeo Ac2-26 (4 horas após desafio), por duas vias de administração (local e sistêmico), ocorreu a diminuição do acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural, no tempo de 24 h (Figura 14A) sem modificação no número de células mononucleares (Figura 14B). De maneira interessante, a administração do pan inibidor de caspases zVAD-fmk impediu a resolução induzida por Ac2-26 (Figura 14A). De nota, o tratamento com zVAD-fmk sozinho não alterou a cinética de recrutamento de neutrófilos após injeção de LPS (SOUSA *et al.*, 2010).



**Figura 14. Efeito da administração de Ac2-26, um peptídeo N-terminal de AnxA1, durante a pleurisia induzida por LPS.** Camundongos foram injetados com LPS (250ng/cavidade, i.pl.) ou PBS e 4h depois receberam uma injeção local de Ac2-26 (100 µg/cavidade, i.pl. ou i.p.) ou veículo. O pan inibidor de caspase zVAD-fmk (1 mg/kg, i.p.) foi administrado 15 minutos antes do peptídeo. O número de neutrófilos (A) e células mononucleares (B) foram avaliados 20h após o tratamento com as drogas, ou seja, 24h após desafio com LPS). Resultados são expressos como número de neutrófilos ou células mononucleares por cavidade e são mostrados como média ± EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. \*\*\*, P < 0.001, quando comparado com animais injetados com PBS, e #, P < 0.05 ou ##, P < 0.01 quando comparado com animais veículo desafiados com LPS.

Em seguida, investigamos se a apoptose foi o mecanismo responsável pela diminuição do número de neutrófilos após tratamento com o peptídeo. Podemos observar na Figura 15 que o tratamento com Ac2-26 induziu a apoptose de neutrófilos na cavidade pleural, como mostrado por critérios morfológicos e bioquímicos (Figuras 15A e 15B). A apoptose foi impedida pelo pan inibidor de caspase zVAD-fmk (Figura 15A). Exemplos de neutrófilos apoptóticos 4h após tratamento com o peptídeo Ac2-26 são mostrados na Figura 15C.

A apoptose de neutrófilos é controlada por uma rede complexa de vias de sinalização que regulam tanto a rotatividade de moléculas da família Bcl-2 quanto ativação das proteases caspases (BIANCHI *et al.*, 2006). Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que rolipram e o LY294002 (um inibidor de PI3K/Akt) induz a apoptose de células inflamatórias acompanhado pela diminuição dos níveis celulares de Mcl-1 (SOUSA *et al.*, 2010), uma proteína anti-apoptótica da família Bcl-2, que regula a sobrevivência de neutrófilos (DZHAGALOV *et al.*, 2007). Assim, foi investigada a capacidade de Ac2-26 de regular vias de apoptose (Bax, caspase-3) e de sobrevivência (Mcl-1, ERK1/2 e NF- $\kappa$ B), as quais previamente demonstraram ser importantes reguladores da meia vida dos neutrófilos (SAWATZKY *et al.*, 2006; WARD *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2011). Observamos que a apoptose induzida por Ac2-26 foi acompanhada pelo aumento de Bax e caspase-3 clivada e diminuição dos níveis celulares de Mcl-1, fosforilação de ERK1/2 e I $\kappa$ B $\alpha$ , proteínas associadas com a sobrevivência de neutrófilos.



**Figura 15. Efeito da administração de Ac2-26, um peptídeo N-terminal de AnxA1, na apoptose de neutrófilos.** Células com morfologia apoptótica característica (A, C), e western blot para caspase-3 clivada, Bax, Mcl-1, P-ERK e P-IκB-α (B) foram avaliadas 4h após o tratamento com as drogas, ou seja, 8h após desafio com LPS. Dados representativos de pelo menos cinco animais em cada grupo. \*,  $P < 0.05$ , quando comparado com animais injetados com PBS, e \*\*\*,  $P < 0.01$  quando comparado com animais veículo desafiados com LPS. *Blots* são representativos de três experimentos independentes em pools de células de pelo menos cinco animais. Para controle, as membranas foram avaliadas com anti-β-actina. (C) Figura representativa de neutrófilos não apoptóticos (asterisco), neutrófilos apoptóticos (setas) e células apoptóticas dentro de macrófagos (pontas de setas). Animais tratados com PBS e veículo (painel superior) e tratamento com Ac2-26 (painel inferior). Ampliações originais, 100x.

## 6 - DISCUSSÃO

Os glicocorticóides (GCs) são potentes drogas anti-inflamatórias e imunossupressoras amplamente usadas para o tratamento de várias doenças inflamatórias. As ações dos GCs endógenos não são completamente entendidas e pode depender da indução de proteínas regulatórias anti-inflamatórias (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009; BEAULIEU e MORAND, 2011). Neste estudo, descrevemos a cinética da apoptose de polimorfonucleares (e resolução da inflamação) em um modelo de pleurisia induzida por LPS e fornecemos o detalhamento das vias da indução de resolução por AnxA1. Nossos principais resultados são os seguintes: (i) a expressão de AnxA1 é aumentada durante a resolução natural e induzida por drogas e esse aumento está associado com o aparecimento de neutrófilos apoptóticos na cavidade pleural; (ii) a resolução natural e induzida por dexametasona, da inflamação neutrofílica, foi dependente de AnxA1 uma vez que estratégias de neutralização pelo uso de um anticorpo específico ou bloqueio do seu receptor, impediram a resolução natural e induzida, abolindo fenômenos apoptóticos na cavidade pleural; (iii) a injeção de Ac2-26, um peptídeo N-terminal derivado de AnxA1, promoveu a resolução da inflamação neutrofílica na cavidade pleural, um efeito associado com a indução da apoptose de neutrófilos; (iv) a resolução da inflamação neutrofílica foi associada com a ativação de vias apoptóticas (Bax e caspase-3), e inibição de vias de sobrevivência Mcl-1, ERK1/2 e NF- $\kappa$ B. Portanto, fornecemos neste trabalho uma forte evidência de que AnxA1 seja um mediador da resolução da inflamação por promover a apoptose de neutrófilos *in vivo*.

AnxA1 é um efector conhecido da resolução da inflamação, no entanto suas atividades têm sido predominantemente estudadas no contexto da inibição do recrutamento de leucócitos, como estabelecido em vários modelos de inflamação (GETTING *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 1998; BANDEIRA-MELO *et al.*, 2005; DAMAZO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007). Nossos resultados são os primeiros a mostrar a relevância e dinâmica de AnxA1 na condução da resolução natural *in vivo*. Estes dados contribuem de forma significativa para a concepção de que esta proteína atua fisiologicamente neutralizando o processo inflamatório (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009; PERRETTI e DALLI, 2009).

Além de estudar vias envolvidas com a patogênese do processo inflamatório, é importante identificar terapias que possam acelerar e/ou ativar programas de resolução. Por exemplo, deve ser dada atenção para identificação de drogas que promovam uma resolução apropriada (*resolution safe*), em programas de descoberta de novas drogas, contra terapias de resolução tóxicas, como relatado por Serhan e colaboradores (2007). Isto se deve ao fato de

que muitas drogas anti-inflamatórias, apesar de diminuírem o número de neutrófilos no sítio inflamatório, acabam por também diminuírem o recrutamento de macrófagos, células especializadas em fagocitarem os neutrófilos apoptóticos, promovendo assim uma resolução tóxica. Idealmente, um composto anti-inflamatório para produzir uma resolução apropriada (*resolution safe*) deve possuir múltiplas ações como: inibir o recrutamento de granulócitos, induzir apoptose destas células e a expressão e/ou secreção de mediadores pró-resolutivos endógenos. Compostos como os GCs e inibidores de fosfodiesterase 4, por exemplo, podem aumentar a resolução da inflamação (TEIXEIRA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2007; MCCOLL *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2009). Aqui, foi demonstrado que a capacidade desses compostos de acelerar a resolução neutrofílica foi associada com o aumento da acumulação de AnxA1. Diversas ações dos GCs parecem ser mediadas por AnxA1 (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009) e, de fato, camundongos deficientes de AnxA1 são resistentes a alguns dos efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticóides (HANNON *et al.*, 2003 e YANG *et al.*, 2004). Em nossos experimentos, o aumento de AnxA1 induzido por GCs foi associado com a resolução da inflamação neutrofílica. Mais importante, o bloqueio de AnxA1 com anticorpo, ou o bloqueio do seu receptor com Boc-1, diminuiu a capacidade dos GCs de induzir a resolução da inflamação. Em conjunto, esses dados mostram que AnxA1 é importante não apenas para a resolução natural da inflamação, mas também é relevante para ações pró-resolutivas de certos anti-inflamatórios *in vivo*.

Vários estudos demonstraram que a apoptose de granulócitos precede e desempenha um papel importante na resolução da inflamação neutrofílica e eosinofílica *in vivo* (GILROY *et al.*, 2004; PINHO *et al.*, 2005; ROSSI *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2009; NORLING e SERHAN, 2010; ALESSANDRI *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2011). Na verdade, estratégias que impedem a apoptose tendem a adiar a resolução da inflamação neutrofílica (ELKS *et al.*, 2011). A primeira observação de que AnxA1 poderia induzir a apoptose foi a partir de estudos de McKanna (1995). Outros estudos também têm mostrado uma correlação entre apoptose de neutrófilos e expressão de AnxA1 *in vitro* (PARENTE e SOLITO, 2004). Por exemplo, a superexpressão de AnxA1 em células monocíticas U937 induziu a apoptose espontânea destas células e isto foi associado com a ativação de caspase-3 (SOLITO *et al.*, 2001). Além disso, aplicação exógena de AnxA1 em neutrófilos humanos *in vitro* promoveu apoptose, associada com aumento nas concentrações de cálcio e ativação de vias pró-apoptóticas (SOLITO *et al.*, 2003). No entanto, nenhum estudo até então havia estabelecido o papel que AnxA1 poderia desempenhar na apoptose de PMN durante o processo dinâmico e integrado de resolução da inflamação como neste modelo *in vivo* de



pleurisia. Observamos que o tratamento com o peptídeo Ac2-26 induziu a resolução da inflamação neutrofílica e foi associada com o aumento da apoptose dessas células e com a ativação de caspase-3 e Bax. Mais importante, o bloqueio de caspases com zVAD-fmk impediu a apoptose e a resolução da inflamação neutrofílica induzida pelo peptídeo Ac2-26 e o bloqueio de AnxA1 endógena impediu acumulação de Bax, a apoptose, e prolongou a sobrevivência de neutrófilos, mostrando a importância da AnxA1 endógena na indução de apoptose de neutrófilos com consequente resolução da resposta inflamatória

Neste estudo, embora tenhamos utilizado um inibidor inespecífico (Boc-1) para avaliar a influência da ligação da AnxA1 ao seu receptor na indução de seus efeitos pró-resolutivos, é provável que FPR2/ALXR seja o mediador dos efeitos pró-apoptóticos de AnxA1, já que AnxA1 se liga somente ao receptor FPR2/ALX (HAYHOE *et al.*, 2006). Recentemente foi relatado que este receptor está relacionado com a indução dos efeitos pró-apoptóticos *in vivo* de lipoxina A<sub>4</sub>, outro ligante de FPR2/ALXR (EL KEBIR *et al.*, 2009).

Sabe-se que os neutrófilos apoptóticos liberam AnxA1, que pode então atuar sobre os macrófagos promovendo a eferocitose, removendo portanto células apoptóticas *in vitro* (SCANNELL *et al.*, 2007). Além disso, macrófagos tratados com GCs secretam AnxA1 que contribui para o aumento da fagocitose de neutrófilos apoptóticos (MADERNA *et al.*, 2005). Em nossos experimentos, corpos apoptóticos foram encontrados dentro de macrófagos recolhidos da cavidade pleural de camundongos após tratamento com o peptídeo Ac2-26 (Figura 15C), sugerindo que o aumento da captação de células apoptóticas também possa contribuir para o efeito pró-resolutivo da AnxA1. Um recente estudo mostrou a habilidade de AnxA1 endógena modular a fagocitose de neutrófilos apoptóticos em condições não inflamatórias (DALLI *et al.*, 2011). Em conjunto, propomos que durante o curso da inflamação, AnxA1 endógena e exógena pode modular a meia vida de neutrófilos recrutados, promovendo a apoptose bem como sua remoção por fagócitos (eferocitose). Ambos os processos, apoptose e eferocitose, são cruciais para a resolução e podem ser modulados *in vivo*.

Neste trabalho, mostramos que a resolução da inflamação e apoptose de neutrófilos está associada com um aumento da expressão de vias pró-apoptóticas e inibição de vias de sobrevivência. Já foi demonstrado um papel importante de NF-κB na mediação da sobrevivência e de permanência de neutrófilos (LOPES *et al.*, 2011) e nos mecanismos pró-apoptóticos induzidos por dexametasona (SOUSA *et al.*, 2009). Neste contexto, já foi relatado a capacidade de AnxA1 induzir a apoptose de células cancerígenas associado com a inibição de NF-κB (ZHANG *et al.*, 2010). Além disso, já foi demonstrado que a diminuição de Mcl-1

contribuiu para a indução de apoptose causado por rolipram e inibidores de PI3K (SOUSA *et al.*, 2010). De fato, no presente trabalho, ambos os fármacos foram capazes de aumentar os níveis de AnxA1 ativa, e a administração do peptídeo sintético de AnxA1 na cavidade pleural de camundongos foi acompanhada pela diminuição dos níveis de Mcl-1. A relevância das MAPKs para sobrevivência do neutrófilo não foi avaliado com detalhes no nosso trabalho, embora já tenha sido demonstrado que a inibição de ERK1/2 promove a resolução da pleurisia induzida por carragenina através da indução da apoptose de neutrófilos (SAWATZKY *et al.*, 2006). De fato, o aumento nos níveis de fosforilação de ERK1/2 e da atividade de NF- $\kappa$ B em resposta ao LPS são encontrados em macrófagos AnxA1<sup>-/-</sup> (YANG *et al.*, 2009). Em nossos experimentos, estratégias que aumentam a expressão de AnxA1 ou administração de peptídeo derivado de AnxA1 diminuíram a ativação de ambos, NF- $\kappa$ B e ERK1/2 *in vivo*, e isso foi associado com o aumento da apoptose de neutrófilos. De maneira interessante, o bloqueio de AnxA1 impediu a inibição de NF- $\kappa$ B e fosforilação de ERK1/2 tal como induzido pelo tratamento pelos GCs. Em contraste com estes nossos achados *in vivo*, o peptídeo de AnxA1 induz fosforilação transitória de ERK1/2 em macrófagos *in vitro* (DUFTON *et al.*, 2010). Inicialmente, é difícil conciliar esses achados, mas claramente há diferenças entre os modelos experimentais (*in vitro* versus *in vivo*), os tipos celulares em questão (macrófagos versus neutrófilos) e a cinética envolvida (minutos versus horas). Além disso, o número de neutrófilos diminuiu após o tratamento, sugerindo que as alterações na fosforilação de ERK1/2 podem ser devido a resolução de neutrófilos ou devido aos eventos desencadeados pelo tratamento precoce com AnxA1. Em conjunto, os nossos dados mostram que a capacidade de AnxA1 em regular a expressão e/ou atividade de NF- $\kappa$ B e ERK1/2 constitui a base dos efeitos pró-apoptóticos e pró-resolutivos dessa proteína *in vivo*. Isto é semelhante aos efeitos dos GCs *in vivo* (HEASMAN *et al.*, 2003).

De fato, vários efeitos dos GCs são mediados por AnxA1 (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009) e camundongos AnxA1<sup>-/-</sup> são resistentes aos efeitos anti-inflamatórios dos GCs (HANNON *et al.*, 2003). As concentrações fisiológicas de GCs podem regular a taxa intrínseca de apoptose de leucócitos e a sua eficácia depende de um certo número de fatores modulatórios, incluindo o tipo e concentração do GC. A regulação da sobrevivência de granulócitos é dose-dependente e ocorre através do receptor de GC (MCCOLL, 2007). Estudos *in vitro* mostraram que os GCs apresentam uma ação ambígua na apoptose de granulócitos. Embora estas drogas induzam apoptose de eosinófilos, elas induzem um atraso na apoptose de neutrófilos humanos (MEAGHER *et al.*, 1996; COX, 1995) e de roedores (NITTOH *et al.*, 1998) *in vitro*. De forma contrária a esses estudos *in vitro*, Li e colaboradores

(2004) mostraram, assim como no nosso estudo, que a administração *in vivo* de dexametasona foi associada à resolução da inflamação neutrofílica e com a indução da apoptose de neutrófilos. Mais importante, a apoptose de neutrófilos induzida por dexametasona foi associada com a diminuição da ativação de NF- $\kappa$ B, um alvo dos GCs, o qual resulta na indução de efeitos anti-inflamatórios e pró-apoptóticos, efeitos estes também apresentados por AnxA1.

AnxA1 intacta (37 kDa), a forma biologicamente ativa da proteína, é predominantemente encontrada *in vivo* na membrana plasmática de neutrófilos intravasculares aderentes (OLIANI *et al.*, 2001). Uma vez que os neutrófilos extravasam para o local da inflamação, a maioria da AnxA1 intacta é clivada para sua forma inativa de 33 kDa. Proteases de neutrófilos, incluindo elastases e proteinase 3, as quais são encontradas nos locais de inflamação, parecem ser as principais contribuintes para clivagem de AnxA1 (OLIANI *et al.*, 2001; VONG *et al.*, 2007; PEDERZOLI-RIBEIL *et al.*, 2010). Observamos que, quando neutrófilos acumulam na cavidade pleural, a banda de AnxA1 intacta desaparece e o produto de clivagem de AnxA1 de 33 kDa é detectado em altos níveis. No entanto, um controle rigoroso da cinética deste modelo permitiu estabelecer que, nos tempos de resolução da inflamação, a banda da AnxA1 ativa estava aumentada e a clivagem da proteína foi mínima. De forma interessante, compostos que vimos anteriormente aumentar a resolução da inflamação neutrofílica (SOUSA *et al.*, 2010) e eosinofílica (SOUSA *et al.*, 2009), aumentaram a banda de AnxA1 intacta e impediu sua degradação, evidenciando que a modulação de AnxA1 endógena pode ser um mecanismo mais amplo na resolução da resposta inflamatória do que apenas associadas ao tratamento com GCs.

Podemos especular sobre o possível mecanismo pelo qual as drogas anti-inflamatórias utilizadas neste trabalho aumentaram a AnxA1 intacta e diminuíram a sua clivagem. Estes compostos podem atuar estimulando a liberação de AnxA1 (aumentando a expressão da proteína ou mobilizando o *pool* intracelular para exportação e secreção através da fosforilação de AnxA1) (YAZID *et al.*, 2010), diminuindo a expressão e/ou atividade de proteases, ou ambos. Se esteróides e inibidores de PDE4 resolvem a inflamação e aumentam os níveis de AnxA1 intacta de maneira semelhante, isto também não é conhecido e merece ser investigado futuramente. Neste contexto, já foi demonstrado que inibidores de PDE4 tais como rolipram, podem atuar através da liberação de corticosterona endógena (PETTIPHER *et al.*, 1997). No entanto, já foi demonstrado, em trabalhos anteriores do nosso grupo, que outros miméticos do AMP cíclico (dibutilil AMP) ou agentes que elevam seus níveis (forskolin), também resolvem a inflamação neutrofílica (SOUSA *et al.*, 2010), sugerindo que o aumento

do AMP cíclico pode contribuir para os efeitos do rolipram. Desta forma, pretendemos futuramente investigar o efeito do rolipram e de outros miméticos do cAMP em nosso trabalho.

A clivagem é uma forma de gerar fragmentos (peptídeos) com diversas atividades biológicas. Williams e colaboradores (2010), relataram que a AnxA1 clivada de 33 kDa, encontrada nas frações de proteínas solúveis de neutrófilos ativados, apresentavam efeitos pró-inflamatórios através da promoção da ativação de ERK1/2 e da migração transendotelial de neutrófilos. Neste último estudo, nem a proteína intacta de 37 kDa, nem o peptídeo N-terminal de 26 aminoácidos foram capazes de ativar ERK1/2 (WILLIAMS *et al.*, 2010). Além disso, o conceito de que o produto de clivagem de AnxA1 possa ser pró-inflamatório foi relatado em um estudo onde encontraram a forma de 33 kDa em amostras de fluido de lavado bronco-alveolar (BAL) de pacientes com fibrose cística (TSAO *et al.*, 1998). Em contraste com estes potenciais produtos de clivagem pró-inflamatórios de AnxA1, já foi demonstrado que AnxA1 resistente a clivagem exibiu um efeito anti-inflamatório maior ao longo do tempo em comparação com a proteína parental (PEDERZOLI-RIBEIL *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado recentemente que AnxA1 resistente a clivagem acelerou significativamente a resolução da inflamação em um modelo animal de artrite (PATEL *et al.*, 2012). Um estudo recente utilizando PMN necrótico demonstrou que AnxA1 clivada funciona como um sinal quimiotático para macrófagos, propondo um papel na diminuição da reatividade celular após necrose celular secundária (BLUME *et al.*, 2012). Até o presente, não é claro qual a função biológica desses peptídeos gerados a partir da clivagem de AnxA1. Parece que a clivagem de AnxA1 por proteases de neutrófilos é um mecanismo que sobrepõe a ação anti-inflamatória da proteína endógena, incluindo a diminuição da transmigração de neutrófilos e o desprendimento de neutrófilos do leito vascular. No contexto de resolução da inflamação, como nos nossos estudos, AnxA1 intacta foi associada com um maior grau de apoptose de neutrófilos e a subsequente resolução.

## 7 - CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram que AnxA1 endógena desempenha um papel fundamental na condução da resolução natural e induzida por anti-inflamatórios durante a inflamação neutrofílica aguda estabelecida na cavidade pleural de camundongos. Mecanicamente, AnxA1 resolve a inflamação por indução da apoptose de neutrófilos, um efeito mediado pela ativação de caspase-3 e correlacionado com diminuição dos níveis de Mcl-1, com o acúmulo de Bax e inibição da fosforilação de I $\kappa$ B- $\alpha$  e de ERK1/2. Esta é a primeira observação de que AnxA1 promove a apoptose de neutrófilos *in vivo*. Assim, estes resultados reforçam a idéia de que AnxA1 ou seus peptídeos miméticos podem representar uma estratégia anti-inflamatória eficaz para o tratamento de doenças nas quais a acumulação de neutrófilos desempenham um papel relevante.

## 8 - PERSPECTIVAS

Alguns resultados obtidos durante este estudo fizeram surgir novas perguntas. Como vimos que a resolução da inflamação está associada com a apoptose de neutrófilos e aumento na expressão de AnxA1 intacta (37kDa) e, durante o pico da inflamação neutrofílica (8-24h) houve aumento na expressão de AnxA1 clivada (33kDa), nos perguntamos se a inibição da clivagem de AnxA1 poderia promover a resolução da inflamação. Já está bem estabelecido que AnxA1 é clivada por algumas proteases, dentre elas elastase e proteinase-3, e que o tratamento de animais com uma AnxA1 resistente à clivagem aumenta a atividade anti-inflamatória quando comparada à proteína natural (PEDERZOLI-RIBEIL *et al.*, 2010). Nosso objetivo, portanto, é investigar se o aumento da atividade proteásica correlaciona-se com a clivagem de AnxA1 *in vivo*. Além disso, pretendemos verificar se inibidores inespecíficos e/ou específicos para elastase são capazes de interferir no acúmulo de leucócitos e na apoptose na cavidade pleural.

Na resolução induzida por drogas anti-inflamatórias (dexametasona e rolipram), observamos que a administração dessas drogas resultou no aumento dos níveis da AnxA1 intacta. Já foi demonstrado que o rolipram (inibidor de PDE4) pode induzir a liberação de corticosterona endógena (PETTIPHER *et al.*, 1997). Nosso grupo já demonstrou que tanto o rolipram quanto agentes que promovem o aumento do cAMP (dibutilil-AMP e forskolin) induzem a resolução da resposta inflamatória aguda e promovem apoptose de neutrófilos. Nesse contexto, nos perguntamos como o tratamento com o rolipram seria capaz de modular a expressão de AnxA1. O efeito observado poderia estar relacionado com a indução de AnxA1 por GC endógeno ou com a indução da síntese de AnxA1 ou mesmo sua liberação do meio intracelular para a membrana. Ainda podemos nos perguntar se o tratamento com rolipram poderia diminuir a atividade de proteínas relacionadas com a clivagem de AnxA1. Para responder essa questão, pretendemos realizar ensaios *in vitro* utilizando células murinas (RAW 264.7) e células de origem humana (THP-1).

## 9 - REFERÊNCIAS

Alessandri, A.L., Duffin, R., Leitch, A.E., Lucas, C.D., Sheldrake, T.A., Dorward, D.A., Hirani, N., Pinho, V., de Sousa, L.P., Teixeira, M.M., Lyons, J.F., Haslett, C., Rossi, A.G. (2011) Induction of Eosinophil Apoptosis by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor AT7519 Promotes the Resolution of Eosinophil-Dominant Allergic Inflammation. *PLoS One* 6, e25683.

Antonicelli F, De Coupade C, Russo-Marie F, Le Garrec Y. (2001) CREB is involved in mouse annexin A1 regulation by cAMP and glucocorticoids. *Eur J Biochem*; 268: 62-69.

Ariel A, Serhan CN. (2012) New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol*. 2012;3:4.

Bandeira-Melo, C., Bonavita, A.G., Diaz, B.L., PM, E.S., Carvalho, V.F., Jose, P.J., Flower, R.J., Perretti, M., Martins, M.A. (2005) A novel effect for annexin 1-derived peptide ac2-26: reduction of allergic inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 1416-22.

Beaulieu, E., Morand, E.F. (2011) Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 340-8.

Best SM. (2008) Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu Rev Microbiol.* ;62:171-92

Bianchi, S.M., Dockrell, D.H., Renshaw, S.A., Sabroe, I., Whyte, M.K. (2006) Granulocyte apoptosis in the pathogenesis and resolution of lung disease. *Clin Sci (Lond)* 110, 293-304.

Blume, K.E., Soeroes, S., Keppeler, H., Stevanovic, S., Kretschmer, D., Rautenberg, M., Wesselborg, S., Lauber, K. (2012) Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal. *J Immunol* 188, 135-45.

Burg ND, Pillinger MH. (2001) The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol*. Apr;99(1):7-17.

- Clark AR. (2007) Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol.* Sep 15;275(1-2):79-97.
- Cohen JJ. (1993) Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed).* Dec 15;28(12):35-43.
- Cory S, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* Sep;2(9):647-56.
- Cox G. (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol.* May 1;154(9):4719-25.
- Dalli, J., Jones, C.P., Cavalcanti, D.M., Farsky, S.H., Perretti, M., Rankin, S.M. (2011) Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J* 26, 387-96.
- Damazo, A.S., Yona, S., D'Acquisto, F., Flower, R.J., Oliani, S.M., Perretti, M. (2005) Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. *Am J Pathol* 166, 1607-17.
- Dufton, N., Hannon, R., Brancaleone, V., Dalli, J., Patel, H. B., Gray, M., D'Acquisto, F., Buckingham, J. C., Perretti, M., Flower, R. J. (2010) Antiinflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J.Immunol.* 184, 2611–2619
- Dzhagalov, I., St John, A., He, Y.W. (2007) The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* 109, 1620-6.
- El Kebir, D., Jozsef, L., Pan, W., Wang, L., Petasis, N.A., Serhan, C.N., Filep, J.G. (2009) 15-epi-lipoxin A4 inhibits myeloperoxidase signaling and enhances resolution of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 311-9.
- Elks, P.M., van Eeden, F.J., Dixon, G., Wang, X., Reyes-Aldasoro, C.C., Ingham, P.W., Whyte, M.K., Walmsley, S.R., Renshaw, S.A. (2011) Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha (Hif-1alpha) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood* 118, 712-22.



- Ernst J.D., Mall A., Chew G. (1994) Annexins possess functionally distinguishable Ca<sup>2+</sup> and phospholipid binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 29;200(2):867-76.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-2216.
- Flower RJ, Blackwell GJ. (1979) Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature.* Mar 29;278(5703):45.
- Flower RJ. (1988) Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 94:987-1015.5.
- Fox, S., Leitch, A.E., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A.G. (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2, 216-27.
- Gerke V., Moss S.E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* Apr;82(2):331-71.
- Gerke,V., Creutz, C.E., Moss, S.E. (2005) Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jun;6(6):449-61.
- Getting, S.J., Flower, R.J., Perretti, M. (1997) Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol* 120, 1075-82.
- Gilroy, D.W., Lawrence, T., Perretti, M., Rossi, A.G. (2004) Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3, 401-16.
- Goulding N.J., Godolphin J.L., Sharland P.R., Peers S.H., Sampson M., Maddison P.J., Flower R.J. (1990). Antiinflammatory lipocortin-1 production by peripheral blood leukocytes in response to hydrocortisone. *Lancet*; 335: 1416-1418.

Hallett, J.M., Leitch, A.E., Riley, N.A., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A.G. (2008) Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29, 250-7.

Hannon, R., Croxtall, J.D., Getting, S.J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M.J., Gavins, F.N., Perretti, M., Morris, J.F., Buckingham, J.C., Flower, R.J. (2003) Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1<sup>-/-</sup> mouse. *FASEB J* 17, 253-5.

Harris JG, Flower RJ, Perretti M. (1995) Alteration of neutrophiltrafficking by a lipocortin 1 N-terminus peptide. *Eur J Pharmacol*;279:149-57.

Hayhoe, R.P., Kamal, A.M., Solito, E., Flower, R.J., Cooper, D., Perretti, M. (2006) Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood* 107, 2123-30.

Heasman, S.J., Giles, K.M., Ward, C., Rossi, A.G., Haslett, C., Dransfield, I. (2003) Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol* 178, 29-36.

Junttila MR, Li SP, Westermarck J. (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. Apr;22(4):954-65.

Kim S.W., Ko J., Kim J.H., Choi E.C., Na D.S. (2001) Differential effects of annexins I, II, III and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model. *FEBS Lett*; 489: 243-248.

Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. (2001) Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med*. Dec;7(12):1291-7.

Lawrence T. (2009) The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Dec;1(6):a001651.

Lawrence T, Fong C. (2010) The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol*. Apr;42(4):519-23.

- Lee KH, Na DS, Kim JW. (1999) Calcium-dependent interaction of annexin I with annexin II and mapping of the interaction sites. *FEBS Lett*; 442: 143-146.
- Li HP, Li X, He GJ, Yi XH, Kaplan AP. (2004) The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respirology*. Mar;9(1):25-32.
- Lopes, F., Coelho, F.M., Costa, V.V., Vieira, E.L., Sousa, L.P., Silva, T.A., Vieira, L.Q., Teixeira, M.M., Pinho, V. (2011) Resolution of neutrophilic inflammation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 2651-60.
- Lösel R, Wehling M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jan;4(1):46-56.
- Maderna, P., Yona, S., Perretti, M., Godson, C. (2005) Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J Immunol* 174, 3727-33.
- Marchalonis, J. J., Kaveri, S., Lacroix-Desmazes, S., & Kazatchkine, M. D. (2002) Natural recognition repertoire and the evolutionary emergence of the combinatorial immune system. *FASEB J*, vol. 16, no. 8, pp. 842-848.
- Marinissen, M.J., Gutkind, J.S. (2001) G-protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(7):368-76.
- McColl, A., Michlewska, S., Dransfield, I., Rossi, A.G. (2007) Effects of glucocorticoids on apoptosis and clearance of apoptotic cells. *ScientificWorldJournal* 7, 1165-81.
- McKanna, J.A. (1995) Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression. *Anat Rec* 242, 1-10.
- Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. (1996) Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*. Jun 1;156(11):4422-8.
- Medzhitov, R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771-6.

- Milot E, Filep JG. (2011) Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *Scientific World Journal*.11:1948-62.
- Morand E.F., Jefferiss C.M., Dixey J., Mitra D., Goulding N.J. (1994) Impaired glucocorticoid induction of mononuclear leukocyte lipocortin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 37: 207-211.
- Nathan, C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature*. 420(6917):846-52.
- Nittoh T, Fujimori H, Kozumi Y, Ishihara K, Mue S, Ohuchi K. (1998) Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. *Eur J Pharmacol*. Jul 31;354(1):73-81.
- Norling, L.V., Serhan, C.N. (2010) Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J Intern Med* 268, 15-24.
- Nourshargh S, Marelli-Berg FM. (2005) Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol*;26:157-65.
- Oliani, S.M., Paul-Clark, M.J., Christian, H.C., Flower, R.J., Perretti, M. (2001) Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. *Am J Pathol* 158, 603-15.
- Oliani SM, Perretti M. (2001) Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. *Ital J Anat Embryol*;106:69-77.
- Parente, L., Solito, E. (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* 53, 125-32.
- Patel HB, Kornerup KN, Sampaio AL, D'Acquisto F, Seed MP, Girol AP, Gray M, Pitzalis C, Oliani SM, Perretti M. (2012) The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. May 5.

Pederzoli-Ribeil, M., Maione, F., Cooper, D., Al-Kashi, A., Dalli, J., Perretti, M., D'Acquisto, F. (2010) Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature. *Blood* 116, 4288-96.

Peers SH, Smillie F, Elderfield AJ, Flower RJ. (1993) Glucocorticoid-and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leucocytes in vivo. *Br J Pharmacol.* Jan;108(1):66-72.

Pepinsky RB, Sinclair LK, Browning JL, Mattaliano RJ, Smart JE, Chow EP, Falbel T, Ribolini A, Garwin JL, Wallner BP. (1986) Purification and partial sequence analysis of a 37-kDa protein that inhibits phospholipase A2 activity from rat peritoneal exudates. *J Biol Chem.* Mar 25;261(9):4239-46.

Perretti M, Flower RJ. (1996) Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. *Br J Pharmacol*; 118: 605-610.

Perretti M, Gavins FN. (2003) Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci*;18:60-4.

Perretti, M., D'Acquisto, F. (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 9, 62-70.

Perretti, M., Dalli, J. (2009) Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. *Br J Pharmacol* 158, 936-46.

Pettipher, E.R., Eskra, J.D., Labasi, J.M. (1997) The inhibitory effect of rolipram on TNF- $\alpha$  production in mouse blood ex vivo is dependent upon the release of corticosterone and adrenaline. *Cytokine* 9, 582-6.

Pinho, V., Souza, D.G., Barsante, M.M., Hamer, F.P., De Freitas, M.S., Rossi, A.G., Teixeira, M.M. (2005) Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J Leukoc Biol* 77, 800-10.

- Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC (2011) The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol*. Aug;11(4):397-403.
- Raynal P., Pollard H. (1994) The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid binding proteins. *Biochim Biophys Acta*; 1197: 63-93.
- Rescher U, Gerke V. (2004) Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*. Jun 1;117(Pt 13):2631-9.
- Rossi, A.G., Hallett, J.M., Sawatzky, D.A., Teixeira, M.M., Haslett, C. (2007) Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochem Soc Trans* 35, 288-91.
- Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. (2011) The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets*. Apr;12(4):556-62.
- Savill J, Fadok V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. Oct 12;407(6805):784-8.
- Sawatzky, D.A., Willoughby, D.A., Colville-Nash, P.R., Rossi, A.G. (2006) The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am J Pathol* 168, 33-41.
- Scannell, M., Flanagan, M.B., deStefani, A., Wynne, K.J., Cagney, G., Godson, C., Maderna, P. (2007) Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 178, 4595-605.
- Serhan CN, Savill J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. Dec;6(12):1191-7.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., Wallace, J.L. (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* 21, 325-32.

Simon SI, Green, CE. (2005) Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev BiomedEng*;7:151-85.3.

Solito E, de Coupade C, Parente L, Flower RJ, Russo-Marie F. (1998) Human annexin 1 is highly expressed during the differentiation of the epithelial cell line A 549: involvement of nuclear factor interleukin 6 in phorbol ester induction of annexin 1. *Cell Growth Differ.* Apr;9(4):327-36.

Solito, E., de Coupade, C., Parente, L., Flower, R. J. & Russo-Marie, F. (1998) IL-6 stimulates annexin 1 expression and translocation and suggests a new biological role as class II acute phase protein. *Cytokine* 10, 514–521.

Solito E, Romero IA, Marullo S, Russo-Marie F, Weksler BB. (2000) Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *J Immunol.* Aug 1;165(3):1573-81.

Solito, E., de Coupade, C., Canaider, S., Goulding, N.J., Perretti, M. (2001) Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* 133, 217-28.

Solito, E., Kamal, A., Russo-Marie, F., Buckingham, J.C., Marullo, S., Perretti, M. (2003) A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J* 17, 1544-6.

Song IH, Gold R, Straub RH. (2005) New Glucocorticoids on the horizon: repress, don't active! *J Rheumatol*;32(6):1199-207

Sousa, L.P., Carmo, A.F., Rezende, B.M., Lopes, F., Silva, D.M., Alessandri, A.L., Bonjardim, C.A., Rossi, A.G., Teixeira, M.M., Pinho, V. (2009) Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 78, 396-405.

Sousa, L.P., Lopes, F., Silva, D.M., Tavares, L.P., Vieira, A.T., Rezende, B.M., Carmo, A.F., Russo, R.C., Garcia, C.C., Bonjardim, C.A., Alessandri, A.L., Rossi, A.G., Pinho, V., Teixeira, M.M. (2010) PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by

inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *J Leukoc Biol* 87, 895-904.

Souza, D.G., Fagundes, C.T., Amaral, F.A., Cisalpino, D., Sousa, L.P., Vieira, A.T., Pinho, V., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q., Fierro, I.M., Teixeira, M.M. (2007) The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol* 179, 8533-43.

Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgerit F. (2007) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*. Sep 15;275(1-2):71-8.

Suarez F, Rothhut B, Coméra C, Touqui L, Marie FR, Silve C. (1993) Expression of annexin I, II, V, and VI by rat osteoblasts in primary culture: stimulation of annexin I expression by dexamethasone. *J Bone Miner Res*; 8: 1201-1210.

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. Aug;31(8):318-24.

Teixeira, M.M., Gristwood, R.W., Cooper, N., Hellewell, P.G. (1997) Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? *Trends Pharmacol Sci* 18, 164-71.

Teixeira, M.M., Das, A.M., Miotla, J.M., Perretti, M., Hellewell, P.G. (1998) The role of lipocortin-1 in the inhibitory action of dexamethasone on eosinophil trafficking in cutaneous inflammatory reactions in the mouse. *Br J Pharmacol* 123, 538-44.

Tsao, F.H., Meyer, K.C., Chen, X., Rosenthal, N.S., Hu, J. (1998) Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 120-8.

Vong, L., D'Acquisto, F., Pederzoli-Ribeil, M., Lavagno, L., Flower, R.J., Witko-Sarsat, V., Perretti, M. (2007) Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. *J Biol Chem* 282, 29998-30004.

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. Apr 9;284(5412):339-43.



- Ward, C., Walker, A., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A.G. (2004) Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB. *Biochem Soc Trans* 32, 465-7.
- Williams, S.L., Milne, I.R., Bagley, C.J., Gamble, J.R., Vadas, M.A., Pitson, S.M., Khew-Goodall, Y. (2010) A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. *J Immunol* 185, 3057-63.
- Yang, Y.H., Morand, E.F., Getting, S.J., Paul-Clark, M., Liu, D.L., Yona, S., Hannon, R., Buckingham, J.C., Perretti, M., Flower, R.J. (2004) Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 976-84.
- Yang, Y.H., Aeberli, D., Dacumos, A., Xue, J.R., Morand, E.F. (2009) Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J Immunol* 183, 1435-45.
- Yazid, S., Leoni, G., Getting, S.J., Cooper, D., Solito, E., Perretti, M., Flower, R.J. (2010) Antiallergic cromones inhibit neutrophil recruitment onto vascular endothelium via annexin-A1 mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1718-24.
- Yuan SY, Shen Q, Rigor RR, Wu MH. (2012) Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res.* Jan;83(1):82-8.
- Zhang W., Liu HT. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* Mar;12(1):9-18.
- Zhang, Z., Huang, L., Zhao, W., Rigas, B. (2010) Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res* 70, 2379-88.

## 10 - ANEXOS

### ANEXO A – Certificados do Comitê de Ética Experimental



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- CETEA -

#### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 148/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo do recrutamento e sobrevivência dos leucócitos nos tecidos: mediadores e vias de transdução do sinal**", que tem como responsável **Vanessa Pinho da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/ 12/2006**.

Este certificado expira-se em **20/ 12 / 2011**.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 148/2006**, related to the project entitled "**Study of leukocyte recruitment and survival in tissue: mediators and signal transduction pathways**", under the supervision of **Vanessa Pinho da Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 20, 2006**.

This certificate expires in **December 20, 2011**.

Belo Horizonte, 22 de Dezembro de 2006.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prog.ufmg.br](mailto:cetea@prog.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 15/2011**, relativo ao projeto intitulado "**ESTUDO DO PAPEL DE PROTEÍNAS INDUZIDAS POR GLICOCORTICÓIDES NA RESOLUÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA**", que tem como responsável(is) **Lirlândia Pires de Sousa**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **7/12/2011**.

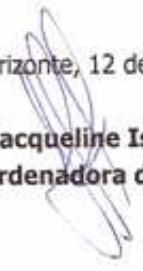
Este certificado expira-se em **7/12/2016**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 15/2011**, related to the project entitled "**ROLE OF GLUCOCORTICOID-INDUCED PROTEINS ON RESOLUTION OF ACUTE INFLAMMATION**", under the supervisors of **Lirlândia Pires de Sousa**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 7, 2011**.

This certificate expires in **December 7, 2016**.

Belo Horizonte, 12 de Dezembro de 2011.

  
**Prof.ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)

## **ANEXO B – Trabalhos publicados**

## Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis

Juliana P. Vago,<sup>\*,†,1</sup> Camila R. C. Nogueira,<sup>†,1</sup> Luciana P. Tavares,<sup>†</sup> Frederico M. Soriani,<sup>†</sup>  
Fernando Lopes,<sup>\*,†</sup> Remo C. Russo,<sup>†,‡</sup> Vanessa Pinho,<sup>\*,†</sup> Mauro M. Teixeira,<sup>†</sup>  
and Lirlândia P. Sousa<sup>\*,†,§,2</sup>

<sup>\*</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Morfologia, <sup>†</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, and <sup>‡</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, and <sup>§</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

RECEIVED JANUARY 6, 2012; REVISED FEBRUARY 10, 2012; ACCEPTED MARCH 6, 2012. DOI: 10.1189/jlb.0112008

### ABSTRACT

This study aimed at assessing whether AnxA1, a downstream mediator for the anti-inflammatory effects of GCs, could affect the fate of immune cells in tissue exudates, using LPS-induced pleurisy in BALB/c mice.

AnxA1 protein expression in exudates was increased during natural resolution, as seen at 48–72 h post-LPS, an effect augmented by treatment with GC and associated with marked presence of apoptotic neutrophils in the pleural exudates. The functional relevance of AnxA1 was determined using a neutralizing antibody or a non-specific antagonist at FPR/ALXRs: either treatment inhibited both spontaneous and GC-induced resolution of inflammation. Injection of Ac2-26 (100 µg, given 4 h into the LPS response), an AnxA1-active N-terminal peptide, promoted active resolution and augmented the extent of neutrophil apoptosis. Such an effect was prevented by the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk. Mechanistically, resolution of neutrophilic inflammation was linked to cell apoptosis with activation of Bax and caspase-3 and inhibition of survival pathways Mcl-1, ERK1/2, and NF-κB. These novel *in vivo* data, using a dynamic model of acute inflammation, provide evidence that AnxA1 is a mediator of natural and GC-induced resolution of inflammation with profound effects on neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 92: 000–000; 2012.

### Introduction

Inflammation is a host-tissue reaction, essential for inactivation of infectious or sterile injurious stimuli, with the main purpose to restore tissue homeostasis. The cardinal signs of inflamma-

tion—dolor, calor, tumor, and rubor—are intrinsically associated to microscope events, such as tissue damage, edema, and leukocyte traffic into the sites of inflammation [1]. In this process, the perpetuation of inflammation represents an important cause for tissue-damage exacerbation and necrosis. Thereafter, unresolved inflammation gives rise to chronic inflammation and autoimmunity, which leads to abnormal repair and alteration in organs with eventual loss of function [2]. It is now evident that the resolution of inflammation is an active and coordinated process, requiring activation of an endogenous program with production of inhibitors and proresolutive molecules, switch in the proteic and lipid mediator class from pro- to anti-inflammatory, and elimination of granulocyte by apoptosis, followed of removal by macrophage phagocytes, restoring tissue homeostasis [2–5].

Annexin A1 is a 37-kDa calcium-dependent phospholipid-binding protein induced by GCs, which bind to and activate FPR [6]. With the use of a combination of pharmacological and transgenic approaches, a role for AnxA1 modulating the inflammatory response has emerged in a variety of rodent inflammatory models [7–12]. Exogenous and endogenous AnxA1 exerts exquisite control on the process of leukocyte recruitment to inflammatory sites, with a modulation of the generation of proinflammatory mediators, including those derived from activation of PLA2, COX-2, and iNOS, as well as of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Recent evidence suggests that AnxA1 may control leukocyte apoptosis *in vitro* [13] and favor their removal by macrophage phagocytosis [14, 15].

The apoptosis of neutrophils is an important event in the resolution of acute inflammation [16–19]. Recognition and

Abbreviations: ALXR=lipoxin A<sub>4</sub> receptor, AnxA1=annexin A1, Boc-1=N-t-Boc-Met-Leu-Phe, Dexam=dexamethasone, GC=glucocorticoid, i.pl.=intrapleural, Mcl-1=myeloid cell leukemia 1, NIS=nonimmune serum, P=phosphorylated, PDE4=phosphodiesterase 4, Wtm=wortmannin

1. These authors contributed equally to this work.

2. Correspondence: Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: lipsousa72@gmail.com or sousa@icb.ufmg.br

removal of apoptotic neutrophils by macrophages limit tissue injury caused by neutrophils at the sites of inflammation [20]. Thus, the induction of neutrophil apoptosis could be of potential benefit in the control of acute inflammatory diseases [16–18]. Although the apoptotic program in neutrophils is a cell-intrinsic process, the rate of apoptosis can be altered dramatically by a number of agents [21]. Therefore, understanding the mechanisms involved in neutrophil recruitment, activation, and survival, at the site of inflammation, may provide new clues for the development of effective pharmacological therapies.

In this study, we investigated the role of the AnxA1 pathway (ligand and receptors) in natural and GC-driven resolution of inflammation, establishing the impact of the process of neutrophil apoptosis for resolution of acute pleurisy. We demonstrate that AnxA1 controls the rate of neutrophil apoptosis in vivo during ongoing exudate formation, thus exerting significant modulation on the resolution phase of this model of acute inflammation.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

All procedures described here had prior approval from the Animal Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG, Protocol Number 148/2006; Brazil). Male BALB/c mice (8–10 weeks), obtained from the Bioscience Unit of Instituto de Ciências Biológicas (Brazil), were housed under standard conditions and had free access to commercial chow and water.

### Drugs, reagents, and antibodies

Rolipram (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA), Wtm (Calbiochem, San Diego, CA, USA), and zVAD-fmk (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA) were diluted in DMSO and further in PBS. Rabbit anti-P-ERK1/2, anti-Bax, anti-Mcl-1, anti-cleaved caspase-3 and mouse anti-P-I $\kappa$ B- $\alpha$  were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Rabbit anti-AnxA1 or secondary anti-rabbit and anti-mouse peroxidase-conjugate antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti- $\beta$ -actin, LPS (from *Escherichia coli* serotype O:111:B4), Boc-1, and Dexa were from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Peptide Ac2-26, a synthetic derivative corresponding to aa 2–26 of the N-terminal region of AnxA1, was a gift of Dr. Mauro Perretti (William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, London, USA). Anti-AnxA-1 antiserum was a kind gift from Dr. Steve Poole (Biotherapeutics Group, National Institute for Biological Standards and Control, UK).

### Leukocyte migration into the pleural cavity induced by LPS

Mice received an i.p. administration of LPS (250 ng/cavity) or PBS, as described previously [22]. Cells present in the pleural cavity were harvested at different times after administration of LPS by washing the cavity with 2 ml PBS and total cell counts performed in a modified Neubauer chamber using Turk's stain. Differential cell counts were performed on cytocentrifuge preparations (Shandon Cytospin III), stained with May-Grünwald-Giemsa using standard morphological criteria to identify cell types. The results are presented as the number of cells/cavity.

### Treatment protocols

To evaluate the role of anti-inflammatory agents on the LPS-induced pleurisy, mice were treated with rolipram (6.0 mg/kg, i.p.), the synthetic GC Dexa (2.0 mg/kg, i.p.), or Wtm (1.0 mg/kg, i.p.) in 4-h LPS-challenged

mice, as described previously [22, 23]. To prevent the action of AnxA1, mice were treated with Boc-1 (2.0 mg/kg, i.v.), a nonselective FPR antagonist that blocks the FPR and ALXR activation or with anti-AnxA1 antiserum (0.1 mL hyperimmune serum diluted in 100  $\mu$ l PBS/ mice, i.p.), 15 min prior to Dexa [11]. Nonimmune goat serum was used as control. To reproduce the action of AnxA1, 4-h LPS-challenged mice were treated with the peptide Ac2-26 (100  $\mu$ g/i.p. or i.p.). zVAD-fmk (1 mg/kg), a broad-spectrum caspase inhibitor [22], was given systemically (i.p.) 15 min before Ac2-26 injection. Drugs were dissolved in DMSO and diluted further in PBS. Control mice received drug vehicle only.

### Assessment of leukocyte apoptosis

Apoptosis was assessed morphologically, as reported previously [18, 22–25]. Briefly, cells ( $5 \times 10^4$ ) collected 8 h after LPS administration were cyto-centrifuged, fixed, and stained with May-Grünwald-Giemsa and counted using oil immersion microscopy ( $\times 100$  objective) to determine the proportion of cells with distinctive apoptotic morphology (cells presented chromatin condensation, nuclear fragmentation, and formation of apoptotic bodies, out or inside macrophages). At least 500 cells were counted/slide, and results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of percentage of cells with apoptotic morphology. The cleavage of caspase-3 and the assessment of the levels of Bcl-2 family proteins (Bax, and Mcl-1) were evaluated by Western blot analysis and used as a biochemical marker of apoptosis. Assessment of apoptosis was also performed by flow cytometry using FITC-labeled annexin-V (ApoDETECT Annexin V-FITC kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and PI as an index of loss of nuclear membrane integrity.

### Lysate preparation and Western blot analysis

Inflammatory cells harvested from the pleural cavity were washed with PBS, and whole-cell extracts were prepared as described [22–24]. Protein amounts were quantified with the Bradford assay reagent from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Extracts (40  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on a denaturing, 10–15% polyacrylamide-SDS gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes, as described [26]. Membranes were blocked overnight at 4°C with PBS containing 5% (w/v) nonfat dry milk and 0.1% Tween-20, washed three times with PBS containing 0.1% Tween-20, and then, incubated with specific primary antibodies (cleaved caspase-3, Bax, Mcl-1, P-ERK1/2, P-I $\kappa$ B- $\alpha$ , AnxA-1, or anti  $\beta$ -actin) using a dilution of 1:1000 in PBS containing 5% (w/v) BSA and 0.1% Tween-20. After washing, membranes were incubated with appropriated HRP-conjugated secondary antibody (1:3000). Immunoreactive bands were visualized by using an ECL detection system, as described by the manufacturer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

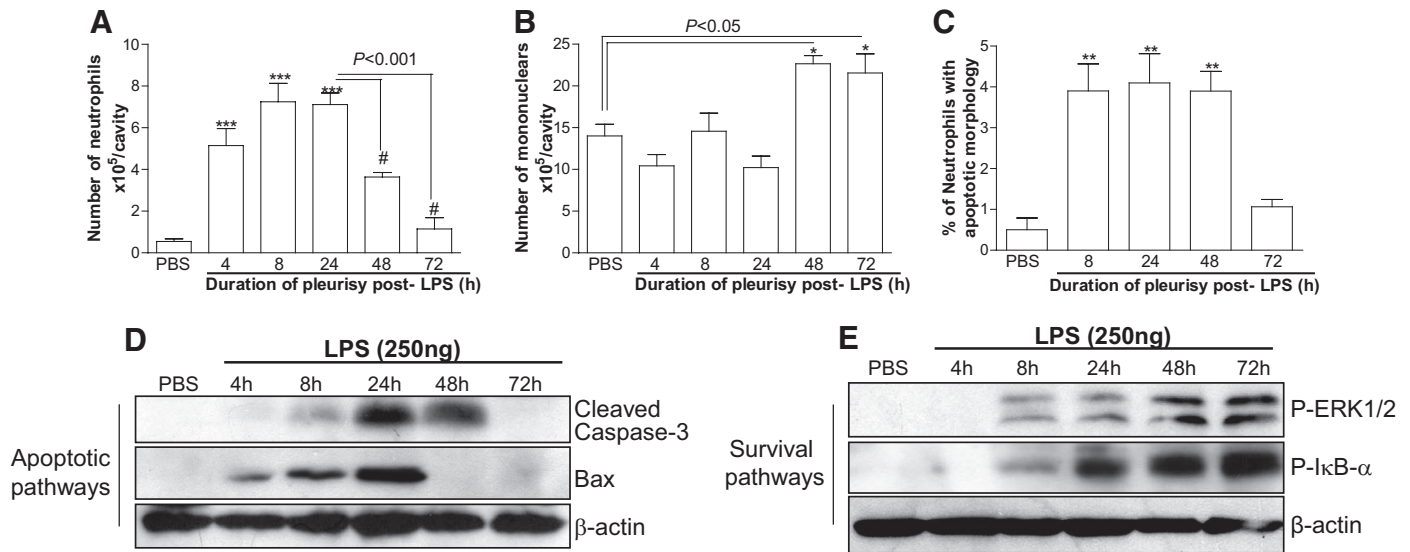
### Statistical analysis

All results are presented as the mean  $\pm$  SEM. Normalized data were analyzed by one-way ANOVA, and differences between groups were assessed using the Student-Newman-Keuls post-test. A *P* value <0.05 was considered significant. Calculations were performed using the Prism 4.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### Spontaneous resolution of LPS-induced pleurisy is associated with neutrophil apoptosis

i.p. injection of LPS induced a time-dependent influx of neutrophils into the pleural cavity of mice, which was high at 4 h and peaked between 8 and 24 h. Neutrophil numbers diminished at 48 h, and complete resolution occurred only at 72 h (Fig. 1A). The cellularity of the pleural cavity consisted of 98–100% mononuclear cells in PBS-injected mice, whereas 50–



**Figure 1. Resolution of LPS-induced pleurisy is associated with increased mononuclear recruitment and activation of a proapoptotic program.**

Mice were injected with PBS or LPS (250 ng/cavity, i.pl.), and a number of neutrophils (A), mononuclear cells (B), and cells with distinctive apoptotic morphology (C) were evaluated at various times. Results are expressed as the number of cells/cavity or percent of neutrophils with distinctive apoptotic morphology and are shown as the mean  $\pm$  SEM of at least five mice in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , or \*\*\* $P < 0.001$  when compared with PBS-injected mice; # $P < 0.001$  when compared with 24-h LPS-challenged mice. (D and E) Western blotting analysis of cleaved caspase-3, Bax, P-ERK1/2, and P-I $\kappa$ B- $\alpha$ . Whole-cell extracts were obtained from inflammatory cells harvested from pleural cavity at various times and processed for Western blot, as described in Materials and Methods. For loading control, membranes were reprobated with anti- $\beta$ -actin. Blots are representative of three independent experiments in pools of cells from at least five animals.

60% of neutrophils and 40–50% mononuclear cells could be quantified in LPS-injected mice for the 8- to 24-h period (Fig. 1A). Figure 1B reports absolute cell numbers, showing that there was no increase in mononuclear cells, 8–24 h after LPS challenge; thereafter, there was an important increase of these cells in the pleural cavity, which coincided with the resolution of neutrophil influx (48- to 72-h phase).

The spontaneous resolution of neutrophilic inflammation was associated with an increase in the number of apoptotic cells, as seen from 8 to 48 h, time-points that preceded complete resolution. Apoptosis was demonstrated by morphological criteria (Fig. 1C), caspase-3 cleavage, and Bax accumulation (Fig. 1D). Conversely, the profile of the pro-survival proteins P-ERK1/2 and P-I $\kappa$ B- $\alpha$ , during LPS-induced pleurisy, is shown in Fig. 1E; these pro-survival proteins are detected in correspondence with neutrophil recruitment, with a marked increase associated with the recruitment of mononuclear cells into the pleural cavity (Fig. 1B).

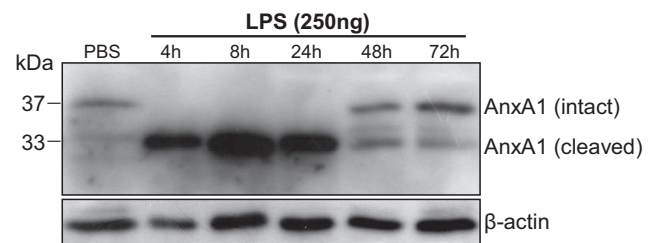
### Spontaneous resolution of LPS-induced pleurisy is paralleled by increased levels of AnxA1

Intact AnxA1 (37-kDa) protein was detected in PBS-challenged mice, but its expression decreased markedly during the active phase of LPS-induced neutrophil recruitment (4- to 24-h postinjection). Intriguingly, intact AnxA1 expression was regained during the resolution phase of this inflammatory response (48–72 h; Fig. 2). Conversely, the 33-kDa breakdown product of AnxA1 was barely detected in PBS-injected mice and strongly detected during the time-points of high neutro-

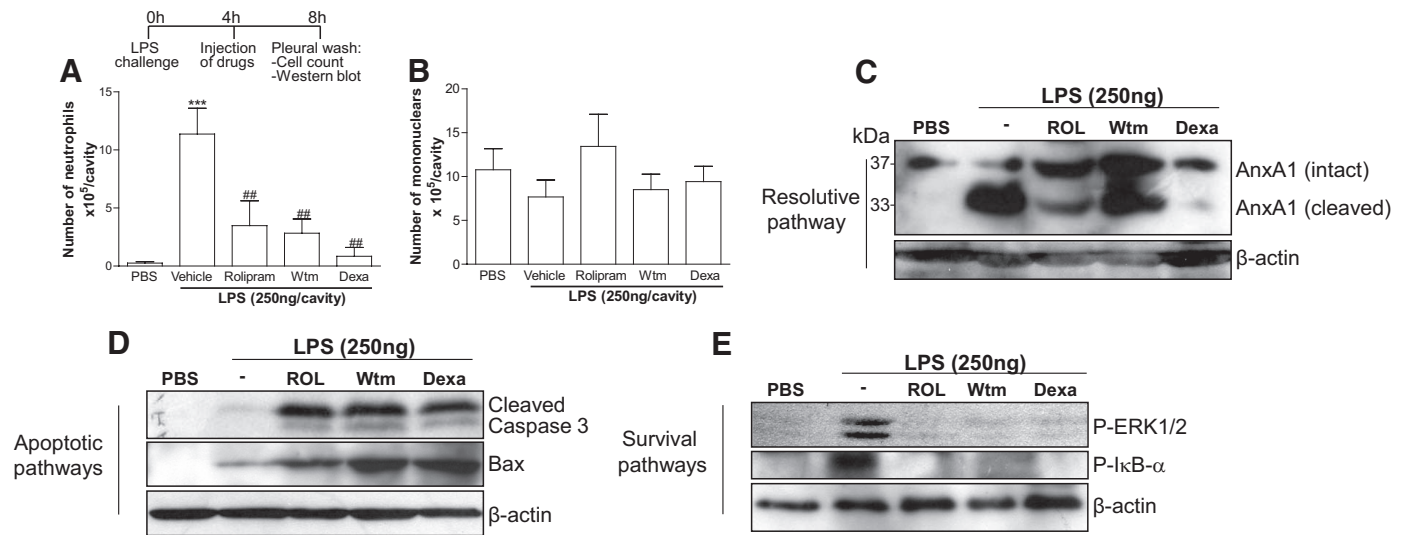
phil counts in pleural fluid (4–24 h), yet it virtually disappeared during the resolution phase of inflammation (48–72 h; Fig. 2).

### Anti-inflammatory drugs up-regulate AnxA1 and activate the neutrophil apoptosis cascade

We have demonstrated previously that treatment of mice with rolipram, a PDE4 inhibitor, after inflammation had been established, decreased the number of neutrophils and increased apoptotic events in the pleural cavity of mice in a PI3K/Akt-dependent manner [22]. Next, we examined the



**Figure 2. Time-course of AnxA1 expression during LPS-induced pleurisy.** Mice were injected with LPS (250 ng/cavity, i.pl.), and at several time-points, the inflammatory cells were harvested from pleural cavity and processed for Western blot analysis to detection of AnxA1 levels. For loading control, membranes were reprobated with anti- $\beta$ -actin. Blots are representative of three independent experiments in pools of cells from at least five animals.



**Figure 3. Effect of anti-inflammatory drugs on the levels of AnxA1 and key proteins associated with apoptosis and cell survival.** Mice were injected with LPS (250 ng/cavity, i.pl.) or PBS and 4 h later, received a systemic injection of rolipram (ROL; 6 mg/kg, i.p.), Dexa (2 mg/kg, i.p.), Wtm (1 mg/kg, i.pl.), or drug vehicle. Numbers of neutrophils (A), mononuclear cells (B), and Western blot for detection of proteins associated with resolutive, apoptotic, and survival pathways (C–E) were evaluated, 4 h after drug treatment, i.e., 8 h after LPS challenge. Results are expressed as the number of neutrophils or mononuclear cells/cavity and are shown as the mean  $\pm$  SEM of at least five mice in each group. \*\*\* $P < 0.001$  when compared with PBS-injected mice; ## $P < 0.01$  when compared with vehicle-treated, LPS-challenged mice. (C–E) Whole extracts from cells harvested from the pleural cavity were analyzed by Western blot for detection of proteins from resolutive (AnxA1), apoptotic (caspase-3 cleavage and Bax), and survival (P-ERK1/2 and P-I $\kappa$ B- $\alpha$ ) pathways. For loading control, membranes were reprobed with anti- $\beta$ -actin. Blots are representative of three independent experiments in pools of cells from at least five animals.

effect of rolipram, Wtm (a PI3K/Akt inhibitor), and Dexa (a synthetic GC) on the resolution of neutrophilic inflammation in the pleural cavity and whether induction of AnxA1 was associated with this scenario. **Figure 3** shows that treatment of mice with these drugs reduced the number of neutrophils (Fig. 3A), without altering mononuclear cell counts in the pleural cavity (Fig. 3B). Such an effect was accompanied by increased levels of intact AnxA1 in the inflammatory extracts (Fig. 3C). Importantly, drug treatment prevented AnxA1 cleavage, as seen by decreased levels of 33 kDa AnxA1-breakdown product, as compared with LPS alone (Figs. 3C, 4C, and 5C).

Next, we evaluated whether increased levels of intact AnxA1, promoted by treatment with rolipram, Wtm, or Dexa, were associated with an increase in number of apoptotic cells in the pleural cavity. We found a positive correlation between intact AnxA1 and activation of a proapoptotic program centered on caspase-3 cleavage, Bax accumulation, and decreased phosphorylation levels of ERK1/2 and I $\kappa$ B- $\alpha$  (Fig. 3D and E).

### Blockade of the AnxA1 pathway prevents natural and Dexa-driven resolution of neutrophilic inflammation

The functional relevance of AnxA1 in this model of resolving inflammation was then determined. A neutralizing strategy against endogenous AnxA1 was carried out using specific anti-AnxA1 antiserum or a nonselective FPR/ALXR antagonist. Administration of anti-AnxA1 (Fig. 4) or Boc-1 (Fig. 5) prevented

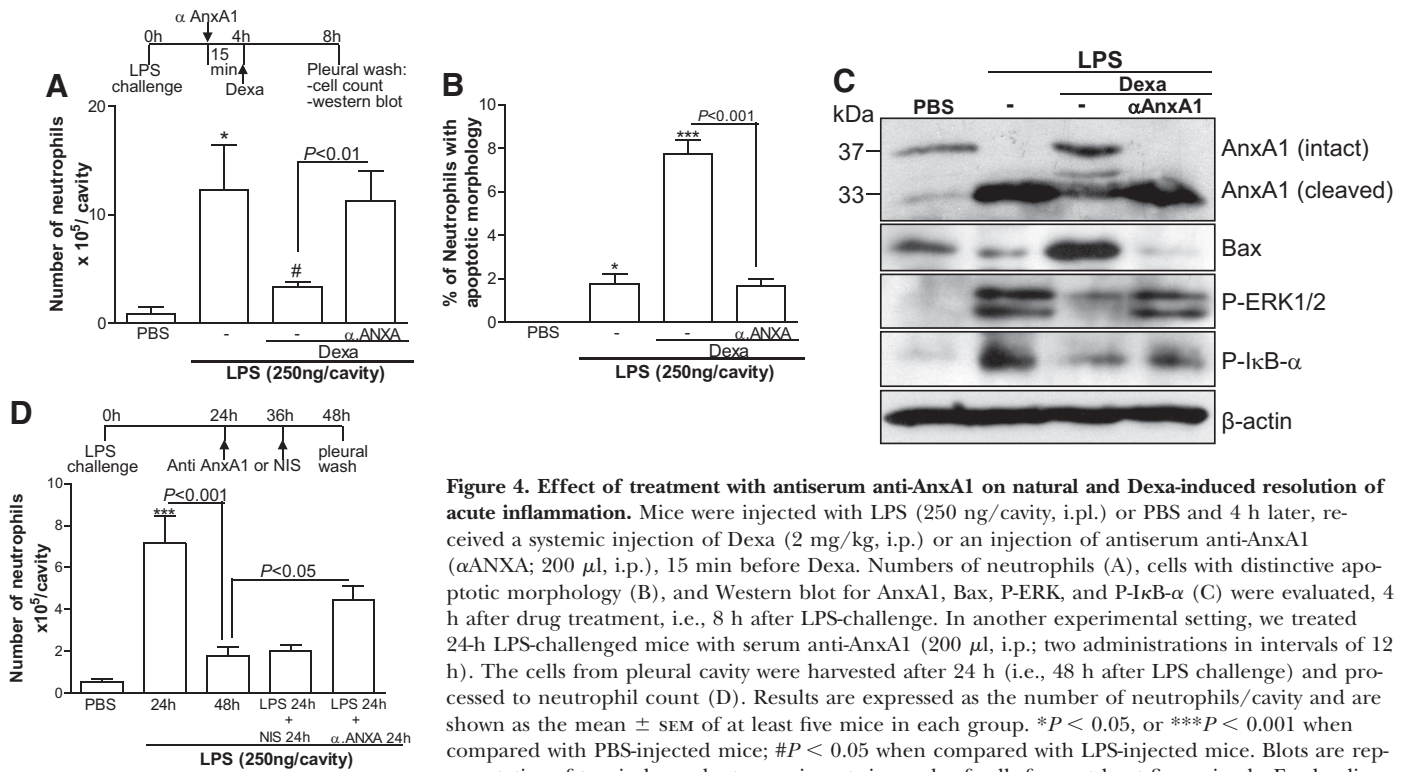
Dexa-induced resolution of neutrophilic inflammation (Figs. 4A and 5A); such effect was associated with decreased expression of intact AnxA1 (Figs. 4C and 5C) and apoptotic events (as seen by decreased Bax and neutrophils with apoptotic morphology; Figs. 4B and C and 5B and C) in pleural exudates. In addition, anti-AnxA1 treatment prevented a Dexa-induced decrease of P-ERK1/2 and P-I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation (Fig. 4C), with very similar data obtained after Boc-1 treatment (Fig. 5C, and data not shown). Of note, treatment of mice with rolipram and Dexa also decreased LPS-induced cleavage of AnxA1 protein (Figs. 4C and 5C).

We also analyzed the effects of anti-AnxA1 serum and Boc-1 on spontaneous resolution of LPS-induced pleurisy. Delivery of these treatments at the 24-h time-point, post-LPS, delayed natural resolution, as determined at 48 h (Figs. 4D and 5D), suggesting that endogenously produced AnxA1 is part of a physiological, proresolutive program. Of note, treatment of mice with a goat NIS had no effect on the resolution of inflammation (Fig. 4D).

### An AnxA1 peptidomimetics promotes resolution of LPS-induced pleurisy by inducing neutrophil apoptosis

The data gathered so far indicate that expression of AnxA1 is induced during natural and drug-induced resolution of acute inflammation (Figs. 2 and 3), and strategies that inhibit AnxA1 prevent resolution by decreasing AnxA1-mediated apoptotic events in the pleural cavity (Figs. 4 and 5). Next, we evaluated the effect of exogenously administered

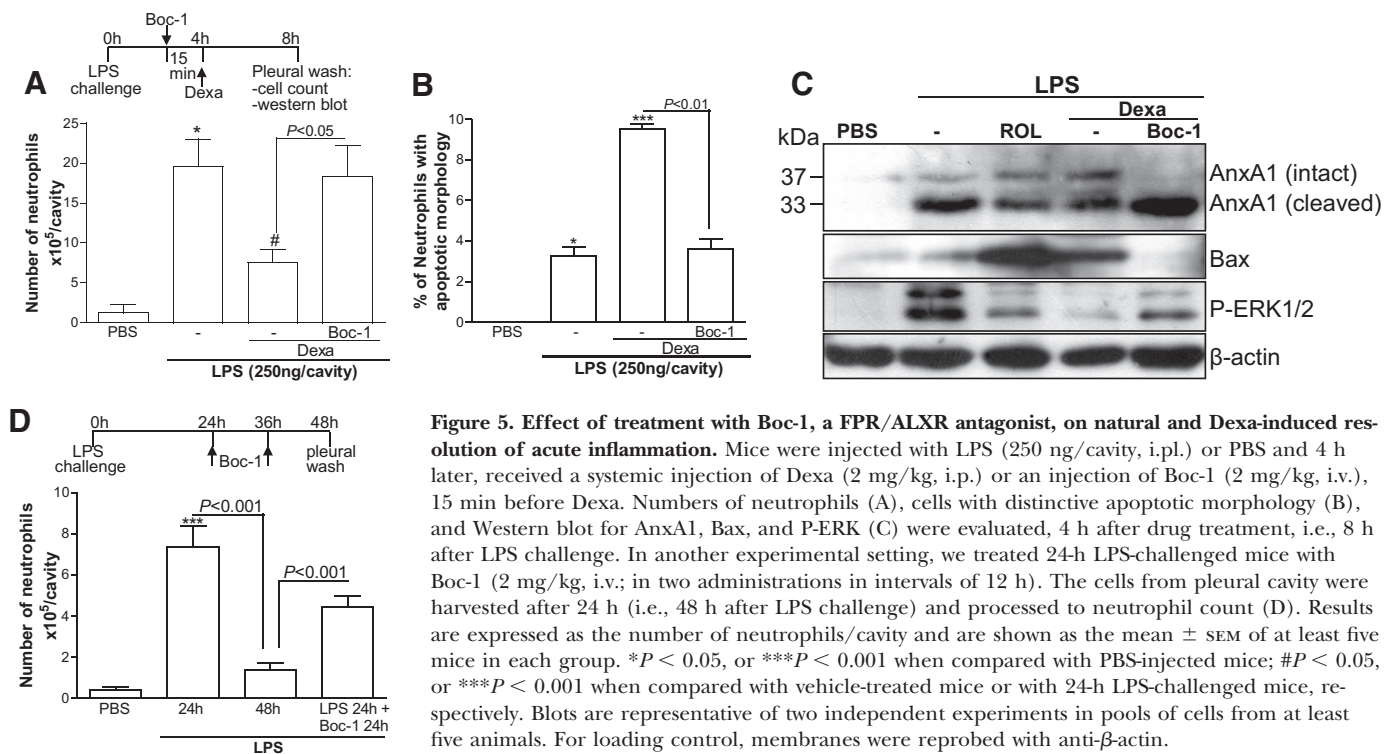




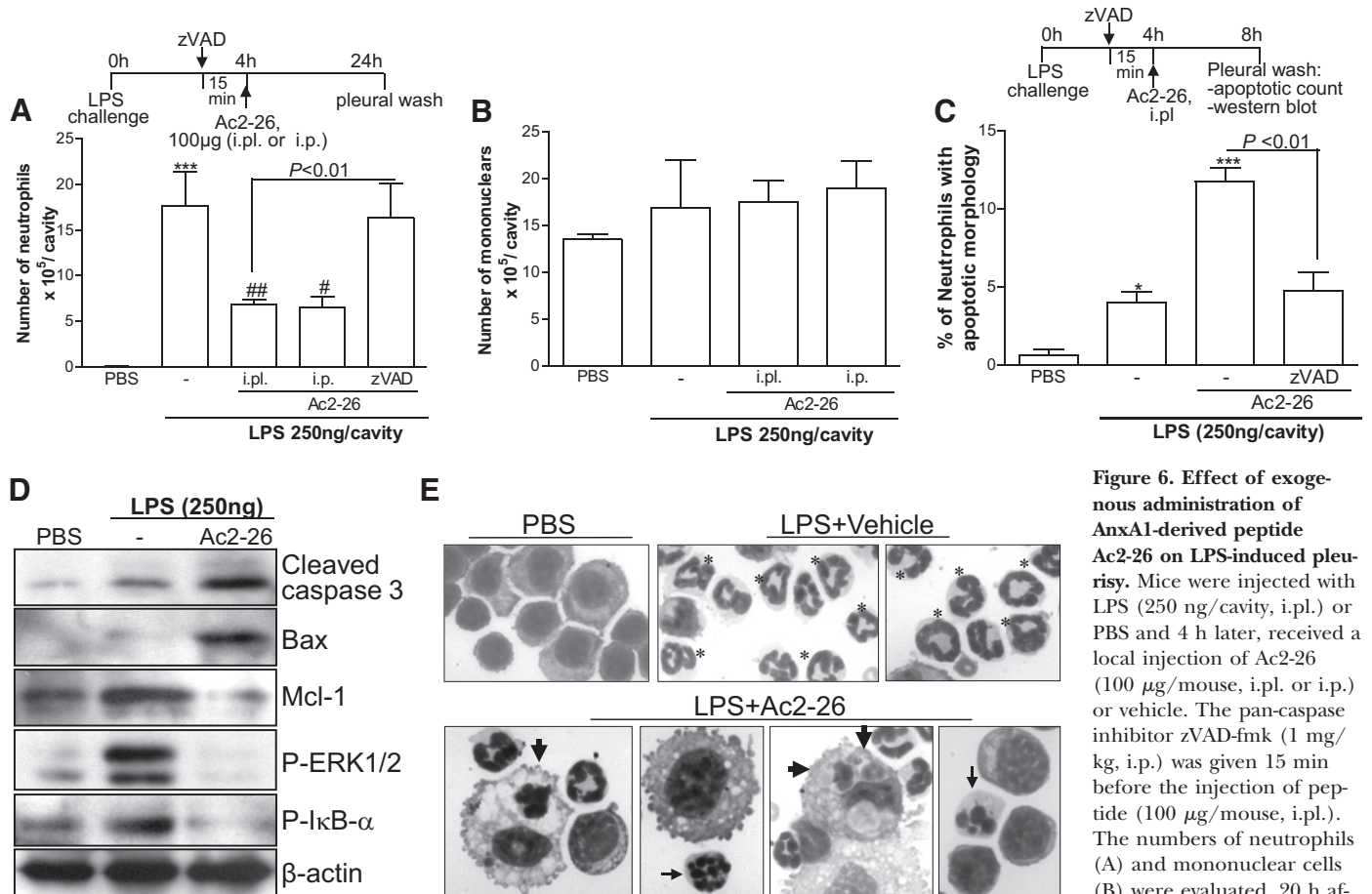
**Figure 4. Effect of treatment with antiserum anti-AnxA1 on natural and Dexamethasone-induced resolution of acute inflammation.** Mice were injected with LPS (250 ng/cavity, i.p.) or PBS and 4 h later, received a systemic injection of Dexamethasone (2 mg/kg, i.p.) or an injection of antiserum anti-AnxA1 (αANXA; 200 μl, i.p.), 15 min before Dexamethasone. Numbers of neutrophils (A), cells with distinctive apoptotic morphology (B), and Western blot for AnxA1, Bax, P-ERK, and P-IκB-α (C) were evaluated, 4 h after drug treatment, i.e., 8 h after LPS-challenge. In another experimental setting, we treated 24-h LPS-challenged mice with serum anti-AnxA1 (200 μl, i.p.; two administrations in intervals of 12 h). The cells from pleural cavity were harvested after 24 h (i.e., 48 h after LPS challenge) and processed to neutrophil count (D). Results are expressed as the number of neutrophils/cavity and are shown as the mean ± SEM of at least five mice in each group. \**P* < 0.05, or \*\*\**P* < 0.001 when compared with PBS-injected mice; #*P* < 0.05 when compared with LPS-injected mice. Blots are representative of two independent experiments in pools of cells from at least five animals. For loading control, membranes were reprobated with anti-β-actin.

AnxA1 on the course of LPS-induced pleurisy. To this end, we treated LPS-inflamed mice with the peptide Ac2-26, which contains the N-terminal, active portion of AnxA1. We found that treatment of 4-h LPS-challenged mice with pep-

tide Ac2-26 (100 μg), by two routes of administration (local and systemic), greatly decreased neutrophil accumulation in the pleural cavity at 24 h (Fig. 6A), without modifying numbers of mononuclear cells (Fig. 6B). Importantly, the ad-



**Figure 5. Effect of treatment with Boc-1, a FPR/ALXR antagonist, on natural and Dexamethasone-induced resolution of acute inflammation.** Mice were injected with LPS (250 ng/cavity, i.p.) or PBS and 4 h later, received a systemic injection of Dexamethasone (2 mg/kg, i.p.) or an injection of Boc-1 (2 mg/kg, i.v.), 15 min before Dexamethasone. Numbers of neutrophils (A), cells with distinctive apoptotic morphology (B), and Western blot for AnxA1, Bax, and P-ERK (C) were evaluated, 4 h after drug treatment, i.e., 8 h after LPS challenge. In another experimental setting, we treated 24-h LPS-challenged mice with Boc-1 (2 mg/kg, i.v.; in two administrations in intervals of 12 h). The cells from pleural cavity were harvested after 24 h (i.e., 48 h after LPS challenge) and processed to neutrophil count (D). Results are expressed as the number of neutrophils/cavity and are shown as the mean ± SEM of at least five mice in each group. \**P* < 0.05, or \*\*\**P* < 0.001 when compared with PBS-injected mice; #*P* < 0.05, or \*\*\**P* < 0.001 when compared with vehicle-treated mice or with 24-h LPS-challenged mice, respectively. Blots are representative of two independent experiments in pools of cells from at least five animals. For loading control, membranes were reprobated with anti-β-actin.



**Figure 6. Effect of exogenous administration of AnxA1-derived peptide Ac2-26 on LPS-induced pleurisy.** Mice were injected with LPS (250 ng/cavity, i.p.) or PBS and 4 h later, received a local injection of Ac2-26 (100 μg/mouse, i.p. or i.p.) or vehicle. The pan-caspase inhibitor zVAD-fmk (1 mg/kg, i.p.) was given 15 min before the injection of peptide (100 μg/mouse, i.p.). The numbers of neutrophils (A) and mononuclear cells (B) were evaluated, 20 h after drug treatment, i.e., 24 h after LPS challenge. Cells

with distinctive apoptotic morphology (C and E) and Western blot to detection of cleaved caspase-3, Bax, Mcl-1, P-ERK, and P-IκB-α (D) were evaluated, 4 h after drug treatment, i.e., 8 h after LPS challenge. There were at least five mice in each group. \**P* < 0.05, or \*\*\**P* < 0.001 when compared with PBS-injected, and #*P* < 0.05, or ##*P* < 0.01 when compared with vehicle-treated, LPS-injected mice. Blots are representative of three independent experiments in pools of cells from at least five animals. For loading control, membranes were probed with anti-β-actin. (E) Representative figures of nonapoptotic (asterisk) and apoptotic (arrows) neutrophils and apoptotic cells inside macrophages (arrowheads). PBS and vehicle (upper panels) and Ac2-26-treated (lower panels) animals are shown. Original magnifications, ×100.

ministration of the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk prevented the resolution by Ac2-26 of LPS-induced neutrophilic inflammation (Fig. 6A). Of note, treatment with zVAD alone did not alter the kinetics of neutrophil recruitment after injection of LPS [22].

Next, we queried whether apoptosis was the underlying mechanism and established that treatment of mice with Ac2-26 induced neutrophil apoptosis in the pleural cavity, as shown by morphological and biochemical criteria (Fig. 6C and D). Apoptosis was prevented by the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk (Fig. 6C). Annexin-V analysis by flow cytometry showed a similar pattern (data not shown). Examples of apoptotic neutrophils at 4 h after treatment with the peptide Ac2-26 are shown in Fig. 6E.

Neutrophil apoptosis is controlled by a complex network of signaling pathways, which regulate the turnover of key molecules of the Bcl-2 family and activation of the caspases family of proteases [27]. We have shown that rolipram and LY294002 (a PI3K/Akt inhibitor) induced apoptosis of inflammatory

cells, which was accompanied by a decrease in the cellular levels of Mcl-1 [22], a key antiapoptotic Bcl-2 family protein regulating neutrophil survival [28]. Thus, we investigated the ability of Ac2-26 to regulate key apoptotic (Bax and caspase-3) and survival (Mcl-1, ERK1/2, and NF-κB) pathways, previously shown to be important regulators of neutrophil fate [24, 29, 30]. We observed that Ac2-26-induced apoptosis of neutrophils and resolution of inflammation were accompanied by an increased, proapoptotic Bcl-2 member Bax and caspase-3 cleavage and by decreased cellular levels of Mcl-1, ERK1/2, and P-IκB-α phosphorylation, proteins associated with neutrophil survival.

## DISCUSSION

GCs are potent anti-inflammatory and immunosuppressive drugs, largely used for the treatment of various severe inflammatory conditions. The actions of endogenous GC are not un-

derstood completely and may depend on the induction of anti-inflammatory regulatory proteins [6, 31]. In this study, we describe the strict kinetics of PMN apoptosis in a model of LPS-induced acute (and resolving) pleurisy and provide the detailed mechanistic pathways of AnxA1-induced resolution. Our major findings are as follows: (i) AnxA1 is up-regulated during natural and drug-induced resolution of acute inflammation, and such increase is associated with appearance of apoptotic neutrophils in the pleural cavity; (ii) natural and Dexa-induced resolution of neutrophilic inflammation was AnxA1-dependent, as neutralization strategies by use of a specific antiserum or by blocking its receptor, prevented natural and GC-induced resolution, abolishing apoptotic phenomena in the pleural cavity; (iii) injection of Ac2-26, an AnxA1-derived N-terminal peptide, promoted resolution of neutrophilic inflammation in the pleural cavity, an effect associated with the induction of neutrophil apoptosis; and (iv) mechanistically, resolution of neutrophilic inflammation was associated with activation of apoptotic pathways Bax and caspase-3 and inhibition of survival pathways Mcl-1, ERK1/2, and NF- $\kappa$ B. Therefore, we provide strong evidence that AnxA1 is a mediator of natural and GC-induced resolution of inflammation by promoting apoptosis of neutrophils *in vivo*.

AnxA1 is a known effector of the resolution of inflammation, yet its activities have been studied predominantly in the context of inhibition of leukocyte recruitment, as established in various models of inflammation [8–12]. Our findings are first to show the relevance and the dynamics of AnxA1 in driving natural resolution of inflammation *in vivo*. These data make substantial contribution to the notion that this protein acts physiologically to counteract the inflammatory process [6, 32].

Besides studying pathogenic pathways, it is important to identify therapeutics that can accelerate and/or activate resolution programs. For instance, the concept that attention should be paid to identify resolution-safe drugs, in drug discovery programs, against resolution-toxic therapeutics has been put forward recently (consensus on resolution; see ref. [5]). As an example, compounds, such as GC and PDE4 inhibitors can enhance the resolution of inflammation [22, 23, 33, 34]. Here, we demonstrated that the ability of these compounds to accelerate neutrophilic resolution was associated with increased accumulation of AnxA1. Several actions of GCs are thought to be mediated by AnxA1 [6], and indeed, AnxA1-deficient mice are resistant to some of the anti-inflammatory effects of GCs [35, 36]. In our experiments, a GC-induced increase of AnxA1 expression was associated with resolution of neutrophilic inflammation. More importantly, blockade of AnxA1 with antibodies or the receptor at which AnxA1 binds with Boc-1 decreased the capacity of GCs to accelerate resolution of inflammation. Altogether, these studies do show that AnxA1 is important, not only for natural resolution of inflammation but is also relevant for the proresolutive actions of certain anti-inflammatory drugs *in vivo*.

We and others have shown that apoptosis precedes and plays a major role in the resolution of acute neutrophilic and eosinophilic inflammation *in vivo* [2, 3, 18, 19, 22–25, 37]. Indeed, strategies that prevent apoptosis tend to delay resolution

of neutrophilic inflammation [38]. The first observation that AnxA1 could induce apoptosis was from studies of McKanna [39]. Other studies have also shown a correlation between neutrophil apoptosis and AnxA1 expression *in vitro* [13]. Interestingly, overexpression of AnxA1 in monocytic U937 cells induced spontaneous apoptosis of these cells, and this was associated with activation of caspase-3 [40]. Furthermore, exogenous application of AnxA1 to human neutrophils *in vitro* promoted apoptosis associated with increased calcium concentrations and activation of proapoptotic pathways [41]. However, no studies have yet established what role AnxA1 could play on PMN apoptosis during the dynamic and integrated process of resolving inflammation, as in this *in vivo* model of LPS pleurisy. In our hands, treatment with the AnxA1 peptide Ac2-26 induced resolution of neutrophilic inflammation, which was associated with increased apoptosis of these cells and activation of caspase-3 and the proapoptotic protein Bax. More importantly, blockade of caspases prevented peptide Ac2-26-induced apoptosis and resolution of neutrophilic inflammation. In line with the latter findings, blockade of endogenous AnxA1 prevented Bax accumulation, neutrophil apoptosis, and prolonged neutrophil survival. The receptor at which AnxA1 binds to induce its proresolving effects was not investigated here. However, it is likely that FPR2/ALX is conveying the proapoptotic effects of AnxA1, as full-length AnxA1 binds FPR2/ALX only [42], and this receptor has recently been reported to mediate the *in vivo*-inducing, proapoptotic effects of LXA(4), another FPR2/ALX ligand [43].

It is known that apoptotic neutrophils release AnxA1, which would then act on macrophages to promote efferocytosis, hence, removal of apoptotic cells *in vitro* [15]. Also, macrophages treated with GCs secrete AnxA1, which contributes to the augmented phagocytosis of apoptotic neutrophils [14]. In our experiments, apoptotic bodies were found inside macrophages recovered from the pleural cavity of mice after treatment with peptide Ac2-26 (Fig. 6E), suggesting that an increased uptake of dying cells may also contribute to the global, proresolving effects. A recent study has shown the ability of endogenous AnxA1 to modulate phagocytosis of apoptotic neutrophils in natural, noninflammatory settings, such as in the bone marrow [44]. Collectively, we propose that during ongoing inflammation, endogenous and exogenous AnxA1 can exert exquisite modulation on the fate of recruited neutrophils by promoting their death by apoptosis, as well as their safe removal by phagocytes (efferocytosis). Both processes—apoptosis and efferocytosis—are crucial for resolution and can be modulated *in vivo*, as shown here, by AnxA1.

In our experimental settings, resolution of inflammation and neutrophil apoptosis is associated with an increase of expression of proapoptotic and inhibition of prosurvival pathways. Specifically, we have shown a major role for NF- $\kappa$ B in mediating survival and permanence of neutrophils [24] and to play an important role in the proapoptotic mechanisms of Dexa [23]. In this regard, the capacity of AnxA1 to induce apoptosis in cancer cells was associated with inhibition of NF- $\kappa$ B [45]. Also, we have been shown that the loss of Mcl-1 contributes to the induction of neutrophil apoptosis caused by rolipram and PI3K inhibitors [22]. Indeed, in the present

work, both drugs were able to increase an AnxA1-active band, and injection of an AnxA1 peptidomimetic into the pleural cavity of mice was accompanied by decreasing levels of Mcl-1. The relevance of MAPKs for survival in our system has not been evaluated in great detail, although inhibition of ERK1/2 is known to promote resolution of carrageenan-induced pleurisy by inducing neutrophil apoptosis [29]. Of note, increased levels of ERK1/2 phosphorylation and NF- $\kappa$ B activity in response to LPS are found in AnxA1<sup>-/-</sup> macrophages [46]. In our experiments, strategies that increased AnxA1 expression or administration of AnxA1 peptide decreased activation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 in vivo, and this was associated with an increase of neutrophil apoptosis. Importantly, blockade of AnxA1 prevented the inhibition of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 phosphorylation, as induced by treatment with GCs. In contrast with our in vivo results, AnxA1 peptide Ac2-26 induces transient ERK1/2 phosphorylation of macrophages in vitro [47]. It is difficult at first to reconcile these findings, but clearly, there are differences in experimental settings (in vitro vs. in vivo), major cell type studies (macrophages vs. neutrophils), and kinetics (few minutes vs. few hours). Moreover, neutrophil numbers decrease after treatment, suggesting that changes in ERK1/2 phosphorylation could be a result of the resolution of neutrophils or a result of downstream events triggered early by AnxA1 treatment. Altogether, our data clearly show that the ability of AnxA1 to regulate the expression and/or activity of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 underlies the proapoptotic and proresolutive effects of this protein in vivo. This is akin to the effects of GCs in vivo [48].

Intact AnxA1 (37 kDa), the biologically active form of the protein, is found predominantly on the plasma membrane of intravascular adherent neutrophils in vivo [49]. Once neutrophils extravasate into sites of inflammation, the majority of intact AnxA1 is cleaved to its inactive form of 33 kDa. Neutrophil proteases, including elastases and proteinase 3, which are found in sites of inflammation, are thought to be the major contributors to cleave AnxA1 [49–51]. We found here that when neutrophils accumulated in the pleural cavity, the intact AnxA1 band disappeared, and the AnxA1-cleaved product of 33 kDa was then present. However, strict monitoring of the kinetics of this model allowed us to establish that at times of resolution of inflammation, the AnxA1-active band was increased and protein cleavage was minimal. Of interest, compounds, which we have previously shown to increase resolution of neutrophilic [22] and eosinophilic [23] inflammation, augmented the AnxA1-intact band and prevented its degradation, making us suggest that modulation of endogenous AnxA1 might be a more general mechanism to resolve inflammatory responses than solely associated with GC treatment. We can speculate about the possible mechanism by which anti-inflammatory drugs increase intact protein and decrease AnxA1 cleavage. These compounds could be acting to stimulate the release of additional AnxA1 (increasing protein expression or mobilizing the intracellular pool to export and secretion by influencing AnxA1 phosphorylation) [52], decreasing the appearance or activity of the protease or

both. Whether steroids and PDE4 inhibitors resolve inflammation and enhance intact AnxA1 levels in a similar way is also not known and clearly deserves further investigation. In this regard, PDE4 inhibitors, such as rolipram, may act by releasing endogenous corticosterone [53]. We have shown that other cAMP mimetics or elevating agents also resolve neutrophilic inflammation [22], suggesting that cAMP may contribute to the effects of rolipram.

Cleavage is a way to generate fragments (peptides) with diverse biological activities. Williams and colleagues [54] have reported that the 33-kDa N-terminally truncated AnxA1 form, found in the soluble protein fractions of activated neutrophils, displays proinflammatory effects by promoting ERK1/2 activation and neutrophil transendothelial migration. In the latter study, neither the full-length protein of 37 kDa nor the N-terminal 26-aa peptide was able to activate ERK1/2 [54]. Moreover, the concept that the cleaved product of AnxA1 might be proinflammatory has been suggested by findings of the 33-kDa form in BAL fluid samples from cystic fibrosis patients [55]. Of note, a cleavage-resistant AnxA1 displayed a stronger anti-inflammatory effect over time compared with the parental protein [50]. In contrast with these potential proinflammatory roles of AnxA1 cleavage products, a recent study using necrotic PMN demonstrated an inhibitory effect of released AnxA1, proposing a fail-safe role in dampening overexuberant cellular reactivity upon cell necrosis in the environment [56]. At the present, it is unclear what the biological function of these AnxA1-generated peptides is. It appears that AnxA1 cleavage by protease-armed neutrophils is a mechanism that over-rides the anti-inflammatory action of the endogenous protein, including diminished neutrophil transmigration and induced neutrophil detachment on vascular beds. In the context of resolution of inflammation, as in our studies, an intact product was associated with a higher degree of neutrophil apoptosis and the ensuing resolution.

To conclude, our data demonstrate that endogenous AnxA1 plays a fundamental role in driving natural and GC-induced resolution of established, acute neutrophilic inflammation in the pleural cavity of mice. Mechanistically, AnxA1 resolves inflammation by inducing apoptosis of inflammatory cells, an effect mediated by activation of caspase-3 and correlated with loss of Mcl-1, Bax accumulation, and inhibition of ERK1/2 and NF- $\kappa$  pathways. This is the first observation that AnxA1 promotes apoptosis of neutrophils in vivo. Hence, these results reinforce the idea that AnxA1 or its peptidomimetic may represent a powerful anti-inflammatory strategy for the treatment of diseases, in which neutrophil accumulation plays a relevant role.

## AUTHORSHIP

L.P.S., V.P., and M.M.T. designed research, analyzed data, and wrote the paper. L.P.S., J.P.V., C.R.C.N., and L.P.T. performed experiments and analyzed data. F.M.S., F.L., and R.C.R. carried out experiments.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais-PRPq (Programa de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados). We thank Dr. Mauro Perretti (Barts and The London School of Medicine, London, UK) for guidance and helpful discussions. We also thank Frankcinéia Assis and Ilma Marçal for technical assistance.

## REFERENCES

- Medzhitov, R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771–776.
- Norling, L. V., Serhan, C. N. (2010) Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J. Intern. Med.* **268**, 15–24.
- Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., Rossi, A. G. (2004) Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 401–416.
- Navarro-Xavier, R. A., Newson, J., Silveira, V. L., Farrow, S. N., Gilroy, D. W., Bystrom, J. (2010) A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. *J. Immunol.* **184**, 1516–1525.
- Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A., Perretti, M., Rossi, A. G., Wallace, J. L. (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* **21**, 325–332.
- Perretti, M., D'Acquisto, F. (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 62–70.
- Babbini, B. A., Laukoetter, M. G., Nava, P., Koch, S., Lee, W. Y., Capaldo, C. T., Peatman, E., Severson, E. A., Flower, R. J., Perretti, M., Parkos, C. A., Nusrat, A. (2008) Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J. Immunol.* **181**, 5035–5044.
- Bandeira-Melo, C., Bonavita, A. G., Diaz, B. L., E Silva, P. M., Carvalho, V. F., Jose, P. J., Flower, R. J., Perretti, M., Martins, M. A. (2005) A novel effect for annexin 1-derived peptide ac2-26: reduction of allergic inflammation in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 1416–1422.
- Damazo, A. S., Yona, S., D'Acquisto, F., Flower, R. J., Oliani, S. M., Perretti, M. (2005) Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. *Am. J. Pathol.* **166**, 1607–1617.
- Getting, S. J., Flower, R. J., Perretti, M. (1997) Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 1075–1082.
- Souza, D. G., Fagundes, C. T., Amaral, F. A., Cisalpino, D., Sousa, L. P., Vieira, A. T., Pinho, V., Nicoli, J. R., Vieira, L. Q., Fierro, I. M., Teixeira, M. M. (2007) The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J. Immunol.* **179**, 8533–8543.
- Teixeira, M. M., Das, A. M., Mioda, J. M., Perretti, M., Hellewell, P. G. (1998) The role of lipocortin-1 in the inhibitory action of dexamethasone on eosinophil trafficking in cutaneous inflammatory reactions in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 538–544.
- Parente, L., Solito, E. (2004) Annexin I: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm. Res.* **53**, 125–132.
- Maderna, P., Yona, S., Perretti, M., Godson, C. (2005) Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J. Immunol.* **174**, 3727–3733.
- Scannell, M., Flanagan, M. B., deStefani, A., Wynne, K. J., Cagney, G., Godson, C., Maderna, P. (2007) Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J. Immunol.* **178**, 4595–4605.
- Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A. G. (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* **2**, 216–227.
- Hallett, J. M., Leitch, A. E., Riley, N. A., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A. G. (2008) Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 250–257.
- Rossi, A. G., Hallett, J. M., Sawatzky, D. A., Teixeira, M. M., Haslett, C. (2007) Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 288–291.
- Savill, J. (1997) Apoptosis in resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 375–380.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., Haslett, C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* **83**, 865–875.
- Ward, C., Dransfield, I., Chilvers, E. R., Haslett, C., Rossi, A. G. (1999) Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 503–509.
- Sousa, L. P., Lopes, F., Silva, D. M., Tavares, L. P., Vieira, A. T., Rezende, B. M., Carmo, A. F., Russo, R. C., Garcia, C. C., Bonjardim, C. A., Alessandri, A. L., Rossi, A. G., Pinho, V., Teixeira, M. M. (2010) PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-κB-independent manner. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 895–904.
- Sousa, L. P., Carmo, A. F., Rezende, B. M., Lopes, F., Silva, D. M., Alessandri, A. L., Bonjardim, C. A., Rossi, A. G., Teixeira, M. M., Pinho, V. (2009) Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-κB. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 396–405.
- Lopes, F., Coelho, F. M., Costa, V. V., Vieira, E. L., Sousa, L. P., Silva, T. A., Vieira, L. Q., Teixeira, M. M., Pinho, V. (2011) Resolution of neutrophilic inflammation by H2O2 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 2651–2660.
- Pinho, V., Souza, D. G., Barsante, M. M., Hamer, F. P., De Freitas, M. S., Rossi, A. G., Teixeira, M. M. (2005) Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 800–810.
- Sousa, L. P., Silva, B. M., Brasil, B. S., Nogueira, S. V., Ferreira, P. C., Kroon, E. G., Kato, K., Bonjardim, C. A. (2005) Plasminogen/plasmin regulates α-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 1065–1071.
- Bianchi, S. M., Dockrell, D. H., Renshaw, S. A., Sabroe, I., Whyte, M. K. (2006) Granulocyte apoptosis in the pathogenesis and resolution of lung disease. *Clin. Sci. (Lond)*. **110**, 293–304.
- Dzhagalov, I., St John, A., He, Y. W. (2007) The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* **109**, 1620–1626.
- Sawatzky, D. A., Willoughby, D. A., Colville-Nash, P. R., Rossi, A. G. (2006) The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am. J. Pathol.* **168**, 33–41.
- Ward, C., Walker, A., Dransfield, I., Haslett, C., Rossi, A. G. (2004) Regulation of granulocyte apoptosis by NF-κB. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 465–467.
- Beaulieu, E., Morand, E. F. (2011) Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 340–348.
- Perretti, M., Dalli, J. (2009) Exploiting the annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 936–946.
- McColl, A., Michlewska, S., Dransfield, I., Rossi, A. G. (2007) Effects of glucocorticoids on apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Sci. World J.* **7**, 1165–1181.
- Teixeira, M. M., Gristwood, R. W., Cooper, N., Hellewell, P. G. (1997) Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 164–171.
- Hannon, R., Croxtall, J. D., Getting, S. J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M. J., Gavins, F. N., Perretti, M., Morris, J. F., Buckingham, J. C., Flower, R. J. (2003) Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J.* **17**, 253–255.
- Yang, Y. H., Morand, E. F., Getting, S. J., Paul-Clark, M., Liu, D. L., Yona, S., Hannon, R., Buckingham, J. C., Perretti, M., Flower, R. J. (2004) Modulation of inflammation and response to dexamethasone by annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**, 976–984.
- Alessandri, A. L., Duffin, R., Leitch, A. E., Lucas, C. D., Sheldrake, T. A., Dorward, D. A., Hirani, N., Pinho, V., de Sousa, L. P., Teixeira, M. M., Lyons, J. F., Haslett, C., Rossi, A. G. (2011) Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation. *PLoS ONE* **6**, e25683.
- Elks, P. M., van Eeden, F. J., Dixon, G., Wang, X., Reyes-Aldasoro, C. C., Ingham, P. W., Whyte, M. K., Walsmsly, S. R., Renshaw, S. A. (2011) Activation of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood* **118**, 712–722.
- McKanna, J. A. (1995) Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression. *Anat. Rec.* **242**, 1–10.
- Solito, E., de Coupade, C., Canaider, S., Goulding, N. J., Perretti, M. (2001) Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br. J. Pharmacol.* **133**, 217–228.
- Solito, E., Kamal, A., Russo-Marie, F., Buckingham, J. C., Marullo, S., Perretti, M. (2003) A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J.* **17**, 1544–1546.

42. Hayhoe, R. P., Kamal, A. M., Solito, E., Flower, R. J., Cooper, D., Perretti, M. (2006) Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood* **107**, 2123–2130.
43. El Kebir, D., Jozsef, L., Pan, W., Wang, L., Petasis, N. A., Serhan, C. N., Filep, J. G. (2009) 15-epi-lipoxin A4 inhibits myeloperoxidase signaling and enhances resolution of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 311–319.
44. Dalli, J., Jones, C. P., Cavalcanti, D. M., Farsky, S. H., Perretti, M., Rankin, S. M. (2011) Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J.* **26**, 387–396.
45. Zhang, Z., Huang, L., Zhao, W., Rigas, B. (2010) Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF- $\kappa$ B and inhibits its activation: anti-cancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **70**, 2379–2388.
46. Yang, Y. H., Aeberli, D., Dacumos, A., Xue, J. R., Morand, E. F. (2009) Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J. Immunol.* **183**, 1435–1445.
47. Dufton, N., Hannon, R., Brancialeone, V., Dalli, J., Patel, H. B., Gray, M., D'Acquisto, F., Buckingham, J. C., Perretti, M., Flower, R. J. (2010) Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J. Immunol.* **184**, 2611–2619.
48. Heasman, S. J., Giles, K. M., Ward, C., Rossi, A. G., Haslett, C., Dransfield, I. (2003) Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J. Endocrinol.* **178**, 29–36.
49. Oliani, S. M., Paul-Clark, M. J., Christian, H. C., Flower, R. J., Perretti, M. (2001) Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. *Am. J. Pathol.* **158**, 603–615.
50. Pederzoli-Ribeil, M., Maione, F., Cooper, D., Al-Kashi, A., Dalli, J., Perretti, M., D'Acquisto, F. (2010) Design and characterization of a cleavage-resistant annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature. *Blood* **116**, 4288–4296.
51. Vong, L., D'Acquisto, F., Pederzoli-Ribeil, M., Lavagno, L., Flower, R. J., Witko-Sarsat, V., Perretti, M. (2007) Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. *J. Biol. Chem.* **282**, 29998–30004.
52. Yazid, S., Leoni, G., Getting, S. J., Cooper, D., Solito, E., Perretti, M., Flower, R. J. (2010) Antiallergic cromones inhibit neutrophil recruitment onto vascular endothelium via annexin-A1 mobilization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1718–1724.
53. Pettipher, E. R., Eskra, J. D., Labasi, J. M. (1997) The inhibitory effect of rolipram on TNF- $\alpha$  production in mouse blood ex vivo is dependent upon the release of corticosterone and adrenaline. *Cytokine* **9**, 582–586.
54. Williams, S. L., Milne, I. R., Bagley, C. J., Gamble, J. R., Vadas, M. A., Pitson, S. M., Khew-Goodall, Y. (2010) A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. *J. Immunol.* **185**, 3057–3063.
55. Tsao, F. H., Meyer, K. C., Chen, X., Rosenthal, N. S., Hu, J. (1998) Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 120–128.
56. Blume, K. E., Soeroes, S., Keppeler, H., Stevanovic, S., Kretschmer, D., Rautenberg, M., Wesselborg, S., Lauber, K. (2011) Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic “find-me” signal. *J. Immunol.* **188**, 135–145.

---

**KEY WORDS:**  
 signaling cascade · dexamethasone · wortmannin · rolipram · Bcl-2 family