

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Mecanismos moleculares da ação dos glicocorticóides endógenos e da anexina-a1
sobre o tráfego de neutrófilos: caracterização da ação sobre os eixos
SDF-1 α /CXCR4 e IL-17/IL-23/G-CSF

Isabel Daufenback Machado

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Machado, Isabel Daufenback

M149m Mecanismos moleculares da ação dos glicocorticoides endógenos e da anexina-A1 sobre o tráfego de neutrófilos: caracterização da ação sobre os eixos SDF-1 α /CXCR4 e IL-17/IL-23/G-CSF / Isabel Daufenback Machado. -- São Paulo, 2013.
113p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Imunologia 2. Hematologia I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.37 CDD

Isabel Daufenback Machado

MECANISMOS MOLECULARES DA AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES
ENDÓGENOS E DA ANEXINA-A1 SOBRE O TRÁFEGO DE NEUTRÓFILOS:
CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO SOBRE OS EIXOS
SDF-1 α /CXCR4 E IL-17/IL-23/G-CSF

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de Doutor

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Julgamento: _____

Instituição:

Assinatura: _____

*A minha sobrinha Gabriela, este serzinho
que amo tanto e sinto muita falta.
Deixo aqui registrado que nenhum dia
se quer me esqueci de você, e todos os dias
peço a Deus para nos encontrarmos.
E quando estivermos juntas, você provavelmente já
estará lendo, poderei lhe mostrar que mesmo de longe
meu pensamento sempre esteve em você.*

***“Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life
You were only waiting for this moment to arise”
Beatles***

Ao meu esposo, meu amigo e colega de trabalho José Roberto. As 24 horas “diárias” que passamos juntos são momentos de cumplicidade, dedicação e amor.

***“Por céus e mares eu andei,
Vi um poeta e vi um rei
Na esperança de saber
O que é o amor.***

***Ninguém sabia me dizer,
Eu já queria até morrer
Quando um velhinho
Com uma flor assim falou:***

***O amor é o carinho,
É o espinho que não se vê em cada flor.
É a vida quando
Chega sangrando aberta
em pétalas de amor”***

Vinicius de Moraes

A minha orientadora Sandra Farsky que se dedica de forma intensa à arte de ensinar e deixa sempre um pouco de si em cada um de nós.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A **gratidão** é o ato de reconhecimento de uma pessoa por alguém que lhe prestou um benefício, um auxílio, um favor etc. E durante esta etapa são muitas as pessoas que diretamente ou indiretamente me ajudaram de alguma forma, por isso agradeço a Deus por ter colocado em meu caminho estas pessoas.

Agradeço meus pais, Adécio e Iracema, por tudo o que proporcionam, principalmente, por esta maravilhosa família que formamos. Que independente do momento que passamos, sempre permanecemos unidos.

Agradeço ao meu irmão e “irmã”, Anderson e Thaís, pela parceria e visitas.

Agradeço ao meu esposo, José Roberto, por estar sempre ao meu lado.

Agradeço a minha orientadora Sandra Farsky por tudo que me ensinou e por ter me ajudado muito cientificamente.

Agradeço aos meus amigos, Taíse, Carine, Vivian, Fê, Bel, Ludmila, Juliano, João Paulo por ouvirem minhas apresentações e reclamações, bem como por me darem conselhos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, funcionários e professores.

Agradeço à FAPESP (2010/08402-2 e 2010/16828-0).

***“Nunca abra a mão dos seus sonhos,
pois se eles morrerem, a vida se torna
igual a um pássaro de asa quebrada:
não consegue voar”***

Langston Hughes

RESUMO

MACHADO, I. D. **Mecanismos moleculares da ação dos glicocorticóides endógenos e da anexina-A1 sobre o tráfego de neutrófilos: caracterização da ação sobre os eixos SDF-1 α /CXCR4 e IL-17/IL23/G-CSF.** 2013. 113f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O tráfego de leucócitos é um processo complexo, dependente da ação de inúmeras substâncias químicas, além da perfeita interação celular. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ação dos GCE e da ANXA1 sobre o eixo SDF-1 α /CXCR4 e IL-17/IL-23/G-CSF e sobre a expressão de moléculas de adesão CD18, CD49d e CD62L. Foram utilizados camundongos machos Balb/C selvagens (WT) ou ANXA1^{-/-}. As avaliações foram realizadas em condições basais, na presença de altas concentrações de GCE e na vigência de processo inflamatório, induzidos pela administração de ACTH (5 μ g/animal, i.p.) ou pela injeção de LPS (100 μ g/kg, i.p.), respectivamente, ou na ausência da ação dos GCE, pela ação do RU 38486 (RU, 10 mg/kg, i.p.). A participação da ANXA1 e do receptor FPR2 foi avaliada pelo pré-tratamento com Ac2-26 (1 mg/Kg, i.p.) ou com BOC2 (10 μ g/animal, i.p.) durante 4 dias, 1 vez ao dia. A quantificação total e diferencial das células foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaços corados por May-Grunwald ou citometria de fluxo. As quantificações de CXCR2, CXCR4, FPR2, CD18, CD49d, CD62L e maturação granulocítica (CD11b/Ly6G) em células da medula e da circulação foram realizadas por citometria de fluxo. A expressão de ANXA1 nos tecidos do estômago e do baço foi realizada por *western blotting* e nas células da medula óssea e sangue circulante foi realizada por imunofluorescência. As quantificações de IL-17, IL-23, G-CSF, SDF-1 α e corticosterona foram realizadas por ELISA. A quimiotaxia de neutrófilos da medula óssea e sangue periférico foi ensaiada na placa de quimiotaxia com filtro de poro de 8 μ m. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos da medula óssea foi avaliada por ensaio *in vitro*. Para verificar os efeitos do ACTH na migração de neutrófilos no processo inflamatório, foi empregado o modelo de bolsa de ar (100 μ g/mL; LPS); e o comportamento dos leucócitos circulantes de animais tratados com ACTH foi avaliado pela técnica de microscopia intravital. Os resultados obtidos, que estão apresentados em quatro temáticas, mostraram que: 1) neutrófilos da medula óssea e sangue periférico expressam ANXA1 no citoplasma e membrana, bem como o receptor FPR2, constitutivamente, e a expressão de ambos é regulada pelos GCE. A ANXA1, via receptor FPR2 expresso em células da medula óssea, controlam a maturação neutrofílica e o tráfego destas células da medula óssea para o sangue. A ANXA1, via interação ao FPR2, controla o *clearance* de neutrófilos do sangue para a medula óssea, modulando o eixo SDF-1 α /CXCR4; 2) A administração do ACTH causa neutrofilia e os neutrófilos circulantes são ANXA1⁺, CD18⁺, CD49d⁺, CD62L⁺, mostrando que injeção do ACTH *in vivo* altera o fenótipo destas células na circulação. Estas modificações alteram o comportamento dos neutrófilos na circulação, bem como a migração para a bolsa de ar na vigência de inflamação e para os tecidos de *clearance*. Estes efeitos podem ser dependentes, pelo menos em parte, da inibição de migração orientada, já que quimiotaxia frente ao fMLP ou ao SDF-1 α estavam reduzidas. Ainda, o *clearance* de neutrófilos é reduzido em animais tratados com o ACTH pela menor atividade fagocítica e secretora dos macrófagos medulares; 3) Animais tratados com RU 38486 e ANXA1^{-/-}

mobilizam granulócitos da medula óssea para o sangue circulante e, deste compartimento para o foco de inflamação com maior intensidade que o observado em animais controles. O eixo IL-17/IL-23/G-CSF parece estar envolvido na granulopoiese e na mobilização de neutrófilos para o sangue durante a inflamação, mas não é alvo de ação da ANXA1 e o GCe nesta etapa do processo inflamatório. Adicionalmente, foi observado que na vigência de peritonite, as moléculas de adesão, CD49d e CD62L estão envolvidas no processo de migração de neutrófilos da medula óssea para o sangue. Os resultados aqui obtidos permitem concluir que os GCe e a ANXA1 são relevantes para granulopoiese e tráfego dos neutrófilos da medula óssea em condições fisiológicas e na vigência de processo inflamatório. Ainda, em conjunto com os dados da literatura, os nossos resultados podem sugerir a participação da ANXA1 dos GCe na plasticidade fenotípica dos neutrófilos de acordo com os estímulos a que são submetidos, e podem auxiliar na compreensão dos novos conceitos sobre a produção, tempo de vida, localização e funções de neutrófilos.

Palavras-chave: anexina-A1, glicocorticóides endógenos, neutrófilo, ACTH, SDF-1 α /CXCR4, IL-17/IL-23/G-CSF e moléculas de adesão.

ABSTRACT

MACHADO, I. D. **Molecular mechanisms of endogenous glucocorticoid and annexin-a1 actions on neutrophil traffic: characterization of this action on the SDF-1 α /CXCR4 e IL-17/IL23/G-CSF axis.** 2013. 113p. Thesis (Doctoral) – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

The traffic leukocytes is a complex process dependent on the action of several chemical mediators, in addition to perfect cell interaction. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of GCe and ANXA1 on SDF-1 α /CXCR4 and IL-17/IL-23/G-CSF and on the expression of adhesion molecules CD18, CD49d and CD62L. Balb/C wild type and ANXA1^{-/-} male mice were employed. The analysis were performed at physiological conditions, in the presence of high concentrations of GCe and during of inflammatory process induced by ACTH administration (5 μ g/animal, i.p.) or LPS injection (100 μ g/kg, i.p.), respectively or in the absence of GCe action, by the action of RU 38486 (RU, 10 mg/kg, i.p.). The involvement of the receptor FPR2 and ANXA1 was assessed by pre-treatment with Ac2-26 (1 mg/kg, i.p.) or BOC2 (10 μ g/animal, i.p.) for 4 days, once a day. The quantification of total and differential cell was performed in a Neubauer chamber and stained smears by May-Grunwald and flow cytometry. Quantification of expression of CXCR2, CXCR4, FPR2, CD18, CD49d, CD62L and granulocytic maturation (CD11b/Ly6G) in the bone marrow and circulation were performed by flow cytometry. The expression of ANXA1 on tissues was performed by western blotting and on cells from bone marrow and blood by immunocytochemistry. Quantification of IL-17, IL-23, G-CSF, SDF-1 α and corticosterone were performed by ELISA. The chemotaxis of neutrophils from the bone marrow and blood was tested in the chemotaxis chamber with filter pore of 8 microns. The phagocytosis of apoptotic neutrophils by bone marrow macrophages was assessed by *in vitro* assay. To investigate the effects of ACTH in the migration of neutrophils in the inflammatory process, the model employed was air pouch (100 μ g/ml, LPS), and the behavior of circulating leukocytes from animals treated with ACTH were evaluated by intravital microscopy. The results obtained, which are presented in three sections, showed that: 1) neutrophils from the bone marrow and blood expressed ANXA1 in the cytoplasm and membrane, as well as FPR2, constitutively and the expression of both is regulated by GCe. The ANXA1 via FPR2 receptor expressed in bone marrow cells, controls the neutrophilic maturation and traffic of these cells from the bone marrow into the blood. The ANXA1 via interaction to FPR2 controls the clearance of neutrophils from the blood to the bone marrow by modulating the SDF-1 α /CXCR4 axis; 2) the administration of ACTH induces neutrophilia and the circulating neutrophils are ANXA1⁺, CD18⁺, CD49d⁺ and CD62L⁺, showing that the injection of ACTH *in vivo* alters the phenotype of these cells in the blood. These modifications alter the behavior of neutrophils in the blood, as well as the migration to the air pouch in the presence of inflammation and to the tissue clearance, and these effects may be dependent, at least in part, on inhibition of migration oriented events, as chemotaxis in response to fMLP or SDF-1 α were reduced. Further, the clearance of neutrophils is reduced in animals treated with ACTH due to the lower phagocytic and secretory activity of medullary macrophages; 3) Animals treated with RU 38486 and ANXA1^{-/-} mobilize granulocytes from bone marrow into the blood, and from this compartment to the focus of inflammation with higher intensity than that observed in the control group. The axis IL-17/IL-23/G-CSF

seems to be involved in granulopoiesis and mobilization of neutrophils into the blood during inflammation, but it is not the target of action of ANXA1 and GCe at this step of inflammatory process. Additionally, it was observed that in the presence of peritonitis, the adhesion molecules, CD49d and CD62L are involved in the migration of neutrophils from the bone marrow into the blood. The results obtained allow concluding that the GCe and ANXA1 are relevant to the granulopoiesis and the traffic of neutrophils from bone marrow under physiological conditions and in the presence of inflammation. Furthermore, together with literature data, the data presented here may suggest the involvement of ANXA1 the GCe in phenotypic plasticity of neutrophils according to the stimuli that are submitted, and may support to understand the new concepts of production, half-life, location and function of neutrophils.

Keywords: annexin-A1, endogenous glucocorticoids, neutrophils, ACTH, SDF-1 α /CXCR4 axis, IL-17/IL-23/G-CSF axis and adhesion molecules.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismo de produção, recrutamento e clearance de neutrófilos na medula óssea em condições de homeostasia..... | 25 |
| Figura 2. Comunicação bidirecional entre o sistema imune e o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal..... | 30 |
| Figura 3. Mecanismos de ação dos glicocorticóides. | 33 |
| Figura 4. Via de indução de expressão de ANXA1 pelos GCs..... | 35 |
| Figura 5. Principais efeitos da fosforilação ANXA1 nos resíduos caracterizados..... | 37 |
| Figura 6. Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com o RU 38486 na inflamação aguda induzida por LPS. | 53 |
| Figura 7. Expressão de anexina-A1 no tecido do baço e estômago de camundongos Balb/C nocautes e selvagem..... | 55 |
| Figura 8. Expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea e sangue periférico de animais tratados com RU 38486. | 59 |
| Figura 9. Expressão de FPR2 em neutrófilos do sangue periférico e em granulócitos da medula óssea de camundongos tratados com RU 38486. | 60 |
| Figura 10. Efeitos dos tratamentos com BOC2 ou Ac2-26 sobre a maturação de granulócitos na medula óssea..... | 61 |
| Figura 11. Expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea e sangue periférico de animais tratados com ACTH..... | 63 |
| Figura 12. Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com Ac2-26 sobre a expressão de CXCR4 e CXCR2 em neutrófilos do sangue periférico. | 64 |
| Figura 13. Efeitos do tratamento <i>in vivo</i> com BOC2 sobre a expressão de CXCR4 e CXCR2 em granulócitos da medula óssea e em neutrófilos do sangue periférico.... | 65 |
| Figura 14. Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com Ac2-26 ou BOC-2 sobre a secreção de SDF-1 α | 66 |
| Figura 15. Esquema representativo dos resultados obtidos que mostram a modulação da ANXA1 no tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue através da regulação do eixo SDF-1 α /CXCR4..... | 70 |
| Figura 16. Expressão de moléculas de adesão e do receptor CXCR4 em neutrófilos do sangue periférico de camundongos Balb/C selvagens e ANXA1 ^{-/-} tratados com ACTH. | 72 |
| Figura 17. Efeito do ACTH na interação leucócito-endotélio <i>in vivo</i> | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Efeito do ACTH na expressão de CXCR4 em neutrófilos do sangue periférico e medula óssea de camundongos Balb/C selvagens. | 74 |
| Figura 19. Efeito do ACTH sobre a atividade fagocítica de neutrófilos apoptóticos por macrófagos medulares e a secreção de G-CSF no sobrenadante e no perfusato medular. | 75 |
| Figura 20. Esquema representativo dos resultados obtidos que mostram as alterações fenotípicas em neutrófilos do sangue periférico mobilizados pela ação do ACTH. | 79 |
| Figura 21. Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com o RU 38486 e da deficiência de ANXA1 sobre a inflamação aguda no peritônio induzida por LPS. | 81 |
| Figura 22. Concentração de IL-17 no perfusato medular, soro e peritônio de animais nocautes ANXA1 ^{-/-} ou camundongos Balb/C selvagens tratados com RU 38486. | 82 |
| Figura 23. Concentração de IL-23 no perfusato medular, soro e peritônio de animais nocautes ANXA1 ^{-/-} ou camundongos Balb/C selvagens tratados com RU 38486. | 83 |
| Figura 24. Concentração de G-CSF no perfusato medular e peritônio de animais ANXA1 ^{-/-} ou camundongos Balb/C selvagens tratados com RU 38486. | 84 |
| Figura 25. Expressão de CD18, CD49d e CD62L em neutrófilos da medula óssea e no sangue de camundongos Balb/C <i>selvagens</i> tratados com RU 38486 e ANXA1 ^{-/-} | 85 |
| Figura 26. Esquema representativo dos resultados obtidos que mostram os mecanismos de controle da ANXA1 sobre o tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue na vigência de inflamação. | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Concentração de corticosterona no plasma sanguíneo. | 54 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| ACTH | Hormônio Adrenocorticotrófico |
| ANXA1 | Anexina A1 |
| AP-1 | Proteína ativadora-1 |
| BLT1 | Receptor de leucotrieno 1 |
| BLT2 | Receptor de leucotrieno 2 |
| CD18 | β 2-integrina |
| CD49d | β 1-integrina |
| CD62L | L-selectina |
| CEUA | Comitê de ética em uso de animais |
| CIBio | Comissão Interna de Biossegurança |
| CREB | Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc |
| COBEA | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| COX-2 | Ciclooxigenase-2 |
| CXCL1 | Quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 |
| CXCL11 | Quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 |
| CXCR2 | Quimiocina (C-X-C motif) receptor 2 |
| CXCR4 | Quimiocina (C-X-C motif) receptor 4 |
| CXCR7 | Quimiocina (C-X-C motif) receptor 7 |
| DUSP-1 | Dupla especificidade da fosfatase-1 |
| EGF-R | Receptor do fator de crescimento epidermal |
| fMLP | Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina |
| FPR1 | Receptor de peptídeos formilados-1 |
| FPR2 | Receptor de peptídeos formilados-2 |
| GATA-3 | Proteína de ligação 3 |
| GC | Glicocorticóide |
| GCe | Glicocorticóide endógeno |
| G-CFU | Unidade formadora de colônias de granulócito |
| G-CSF | Fator estimulante de colônias de granulócitos |
| GILZ | Glicocorticóide induzida leucina zipper |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônias de granulo-monocíticas |
| GR | Receptor de glicocorticóide |

| | |
|---------------|--|
| GRE | Elemento responsivo aos glicocorticóides |
| HPA | Hipotálamo-Hipófise-Adrenal |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular-1 |
| IκBα | Inibidor κBα |
| IL-1β | Interleucina-1β |
| IL-12 | Interleucina-12 |
| IL-17 | Interleucina-17 |
| IL-2 | Interleucina-2 |
| IL-23 | Interleucina-23 |
| INF-γ | Interferon-γ |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| IRF3 | Fator regulador de interferon-3 |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LTB4 | Leucotrieno B4 |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| MC3-R | Receptor de melanocortina-3 |
| NF-AT | Fator nuclear de ativação de células T |
| NF-κB | Fator nuclear Kappa B |
| NO | Óxido nítrico |
| PKA | Proteína quinase A |
| PLA2 | Fosfolipase A2 |
| SDF-1α | Fator derivado de célula estromal-1α |
| STAT3 | Sinal de transdução e ativador da transcrição-3 |
| STAT6 | Sinal de transdução e ativador da transcrição-6 |
| t-Bet | Fator de transcrição específico da célula Th1 |
| TGF-1β | Fator de crescimento tecidual-1β |
| TRPM-7 | Receptores transientes de potencial da melastatina-7 |
| VCAM-1 | Molécula de adesão celular vascular-1 |
| VLA-4 | <i>Very late antigen-4</i> |
| WT | <i>Wild Type</i> (animal selvagem) |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 Eixo SDF-1 α /CXCR4 | 23 |
| 1.2 Eixo IL-17/IL-23/G-CSF | 26 |
| 1.3 Moléculas de Adesão | 28 |
| 1.4 Glicocorticóides e anexina-A1 | 29 |
| 2 OBJETIVOS | 40 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 Animais | 41 |
| 3.2 Tratamentos Farmacológicos | 41 |
| 3.2.1 RU 38486 | 41 |
| 3.2.2 ACTH | 42 |
| 3.2.3 BOC2 | 42 |
| 3.2.4 Ac2-26 | 42 |
| 3.3 Indução da inflamação pelo LPS | 43 |
| 3.4 Obtenção de amostras biológicas | 43 |
| 3.4.1 Coleta de sangue circulante e medula óssea | 43 |
| 3.4.2 Coleta do lavado peritoneal | 43 |
| 3.5 Quantificação dos leucócitos nas amostras | 44 |
| 3.6 Expressão de ANXA1 por Western Blotting | 44 |
| 3.7 Citometria de fluxo para quantificação da expressão de CXCR4/CXCR2 e moléculas de adesão CD18, CD49d e CD62L | 45 |
| 3.8 Análise da maturação granulocítica | 46 |
| 3.9 Expressão do receptor FPR2 em granulócitos da medula óssea e em neutrófilos circulantes | 46 |
| 3.10 Ensaio imunoenzimático | 47 |
| 3.11 Quimiotaxia in vitro | 47 |
| 3.12 Ensaio imunofluorescência | 48 |
| 3.13 Ensaio de fagocitose | 49 |
| 3.14 Inflamação no tecido subcutâneo dorsal – Bolsa de ar | 49 |
| 3.15 Microscopia intravital | 50 |
| 3.16 Análise Estatística | 51 |

| | |
|---|----|
| 4 RESULTADOS | 52 |
| 4.1 SEÇÃO 1: Otimização das condições experimentais propostas..... | 52 |
| 4.1.1 Otimização do tratamento farmacológico in vivo com RU 38486..... | 52 |
| 4.1.2 Otimização do tratamento farmacológico in vivo com ACTH..... | 53 |
| 4.1.3 Otimização da deleção gênica nos animais nocautes para a proteína ANXA1..... | 54 |
| 4.1.4 Discussão..... | 55 |
| 4.2 SEÇÃO 2: ANXA1 modula o tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue através da regulação do eixo SDF-1 α /CXCR4/CXCR2..... | 59 |
| 4.2.1 ANXA1 e o receptor FPR2 são expressos em neutrófilos da medula óssea e do sangue periférico e modulam a maturação neutrofílica..... | 59 |
| 4.2.2 ANXA1 modula a mobilização de neutrófilos maduros da medula óssea para o sangue..... | 62 |
| 4.2.3 ANXA1 altera o perfil de células CXCR4 ⁺ na medula óssea e no sangue periférico..... | 63 |
| 4.2.4 ANXA1 controla a secreção e a quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo SDF-1 α | 65 |
| 4.2.5 Discussão..... | 66 |
| 4.3 SEÇÃO 3: Alterações moleculares em neutrófilos do sangue mobilizados pelo ACTH..... | 71 |
| 4.3.1 ACTH, via GR e ANXA1, altera a expressão de moléculas de adesão e do receptor CXCR4 em neutrófilos do sangue periférico..... | 71 |
| 4.3.2 ACTH modula a interação leucócito-endotélio e a migração de neutrófilos do sangue periférico para o tecido em condições inflamatórias..... | 73 |
| 4.3.3 ACTH modula a atividade fagocítica de macrófagos medulares..... | 74 |
| 4.3.4 Discussão..... | 75 |
| 4.4 SEÇÃO 4: Mecanismos de controle da ANXA1 e dos GCe sobre o tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue na vigência de inflamação..... | 80 |
| 4.4.1 Efeito do bloqueio do GR e da ANXA1 sobre a migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzido pelo LPS..... | 80 |
| 4.4.2 Efeitos da ANXA1 e do bloqueio do receptor citosólico de GCs sobre o eixo IL-17/IL-23/G-CSF..... | 81 |
| 4.4.3 Efeito do bloqueio do GR e da ANXA1 sobre a expressão de CD62L, CD49d e CD18 em neutrófilos da medula óssea e neutrófilos do sangue periférico no modelo de peritonite induzida pelo LPS..... | 84 |
| 4.4.4 Discussão..... | 86 |
| 5 CONCLUSÕES | 90 |

| | |
|---------------------------|------------|
| 6 REFERÊNCIAS..... | 91 |
| ANEXOS | 114 |

1 INTRODUÇÃO

A mobilização leucocitária entre os diferentes compartimentos medula óssea, sangue periférico e tecido é um evento fundamental para uma resposta imune adequada. Os leucócitos produzidos na medula óssea, após diferentes etapas de maturação e diferenciação, são mobilizados para o sangue periférico. No entanto, sabe-se que linfócitos passam por fases de maturação e diferenciação em tecidos periféricos (FINK & HENDRICKS, 2011) e que monócitos se diferenciam em tipos distintos de macrófagos, dependendo do microambiente (SERHAN et al., 2007; GORDON, 2007; MANTOVANI et al., 2013; RECCHIUTI, 2013). Recentemente, dados da literatura mostraram que, em certas condições, neutrófilos maduros podem efetivamente proliferar fora da medula óssea em resposta a mediadores químicos, como a proteína amiloide sérica A, o que pode promover a permanência destas células por maior tempo no tecido (DE SANTO et al., 2010).

No compartimento periférico, os leucócitos circulam até atingirem o estado de senescência e, posteriormente, migram para os tecidos específicos de *clearance*, uma vez que entram em apoptose e são fagocitados por células residentes sendo, em especial, fagocitados por macrófagos (MULLER, 2003; NATHAN, 2006; YONA et al., 2008; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). A mobilização leucocitária é altamente complexa, e depende da capacidade de resposta das células do estroma e dos leucócitos frente à ação de inúmeras substâncias químicas, como fatores de crescimento, proliferativos, quimiotáticos, entre outros, além da perfeita interação celular (PANÉS et al. 1999, NOURSHARGH & MARELLI-BERG, 2005; DAMAZO et al., 2006).

Durante o processo inflamatório, o tráfego de leucócitos é modificado e, na maioria das vezes, o que se observa é a exacerbação do processo fisiológico, para que os leucócitos se locomovam em maior número e com maior velocidade entre os diferentes compartimentos para alcançarem o sítio de agressão. Neste contexto, na reação inflamatória ocorre mobilização celular dos compartimentos de reserva e recrutamento sequencial destas células no curso do processo – neutrófilos seguidos pelas células mononucleares e eosinófilos (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Os neutrófilos são indispensáveis para a resposta do hospedeiro e desempenham papel chave no sistema imune inato, já que respondem prontamente a estímulos inflamatórios, com rápida mobilização da medula para o sangue, o que

permite rápida migração para a área lesada. Desequilíbrios nestes eventos podem prejudicar o desenvolvimento da resposta inflamatória (NATHAN, 2002; HAYHOE et al., 2006; DUCHENE et al., 2007).

Desta forma, a compreensão dos mecanismos que controlam o tráfego de neutrófilos em condições fisiológicas e patológicas é imprescindível para o esclarecimento da gênese de doenças e intervenções farmacológicas. Esta afirmação tem sido reforçada por novos estudos que quebram paradigmas sobre a produção, tráfego e função dos neutrófilos, pois mostram que diferentes subtipos de neutrófilos estão na circulação e que estes possuem plasticidade, apresentando fenótipos distintos em diferentes condições fisiológicas, como as alterações de idade, e em estados de doenças, como as inflamações de diferentes origens (TSUDA et al., 2004; DENNY et al., 2010; PILLAY et al., 2010b; 2012; BEYRAU et al., 2012). Em um recente estudo, Pillay et al. (2010b) mostraram que neutrófilos podem possuir meia vida maior do que 6 a 8 horas na circulação, cerca de 5,4 dias em humanos e 12,5 horas em camundongos. Ainda, durante um processo inflamatório, os neutrófilos tornam-se ativados e seu tempo de meia vida aumenta várias vezes, o que garante a presença de neutrófilos sensibilizados no sítio de inflamação (COLOTTA et al., 1992; SUMMERS et al., 2010). Adicionalmente, alguns estudos sugerem que os neutrófilos podem apresentar transmigração reversa e re-entrar na circulação, além de ser encontrado em órgãos linfoides e pele (BUCKLEY et al., 2006; CHATNOVA et al., 2008; WOODFIN et al., 2011; BEYRAU et al., 2012; KIM & HAYNES, 2012). Em 1984, Gallin reportou a heterogeneidade funcional dos neutrófilos e, trabalhos mais recentes sedimentaram esta informação mostrando diferentes atividades moduladoras no sistema imune por neutrófilos na vigência ou ausência de um processo inflamatório, bem como durante a senescência desta célula (TANEJA et al., 2005; OTTEN et al., 2008; PILLAY et al., 2010b; BEYRAU et al., 2012; PILLAY et al., 2012; SOLANA et al., 2012; LI & NG, 2012). Neste contexto, têm sido demonstrado que neutrófilos no sangue periférico podem regular a resposta imune gerada na vigência de um processo inflamatório pela liberação de citocinas e quimiocinas, além de influenciar diretamente na resposta imune adaptativa por meio do carregamento de patógenos aos linfonodos, apresentação de antígenos e modulação da resposta dos linfócitos Th1/Th2 (PILLAY et al., 2010b; PILLAY et al., 2012).

Os neutrófilos por muito tempo assumiram o papel de células efetoras da fase aguda da resposta inflamatória, no entanto, o papel importante destas células na fase de resolução do processo inflamatório e restabelecimento da homeostasia tem sido demonstrado (JAILLON et al., 2013). A resolução do processo inflamatório é importante para o retorno da homeostasia, pois limita a injúria excessiva do tecido e previne o desenvolvimento de inflamações crônicas. Este processo ocorre primeiramente com a supressão na liberação de mediadores pro-inflamatórios, indução da secreção de mediadores anti-inflamatórios, incluindo IL-10 e TGF-1 β , liberação de enzimas proteolíticas e mediadores lipídicos. A mudança para um ambiente anti-inflamatório facilita a apoptose dos neutrófilos, os quais são fagocitados (eferocitose) por macrófagos residentes. Após a fagocitose, os macrófagos são estimulados para a secreção de altos níveis de mediadores, como as resolvinas, lipoxinas e sirtuinas (LEE & SURH, 2012; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

Os estudos de Matsushima et al. (2013) e Geng et al. (2013) sugerem que o neutrófilo apresenta um papel chave na resposta imune adaptativa, por se portar como uma célula apresentadora de antígeno. As caracterizações fenotípicas e funcionais de neutrófilos imaturos Gr-1^{high}/CD11b^{low}, neutrófilos bastões Gr-1^{high}/CD48^{low} e neutrófilos maduros Gr-1^{high}/CD11b^{high} obtidos da medula óssea de camundongos, quando cultivados *in vitro* e estimulados com GM-CSF, assumem características fenotípicas e funcionais de células dendríticas CD11c⁺ e MHCII⁺, sem perder as propriedades neutrofílicas. Neutrófilos dendríticos Gr-1⁺/CD11c⁺ mostraram atividade fagocítica potente de partículas de látex marcadas, *Escherichia coli*-GFP e dextran conjugado a isotiocianato de fluoresceína. Ademais, um fenótipo de neutrófilos reguladores do processo inflamatório tem sido proposto e caracterizados como CD16^{high} CD62L^{low} ANXA1^{+ve}, os quais liberam baixas concentrações de radicais reativos de oxigênio quando estimulados pelo LPS (PILLAY et al., 2012). Além da interação direta com os macrófagos, células dendríticas, subtipos de linfócitos e secreção de mediadores que regulam suas funções, outras evidências sugerem a participação direta dos neutrófilos na resposta imune inata e adaptativa, tanto na indução como na resolução do processo inflamatório (JAILLON et al., 2013).

Em conjunto, os dados apresentados mostram que o controle da produção e tráfego de neutrófilos representa uma linha de investigação importante, em especial

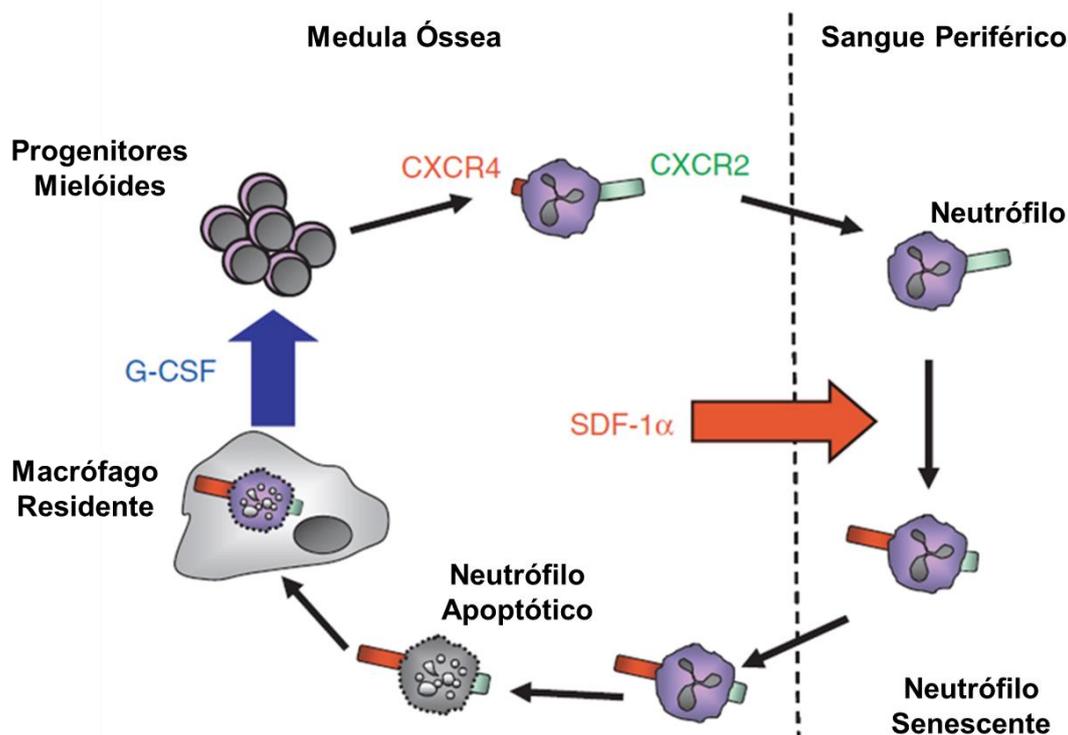
pelas descrições recentes das ações dos neutrófilos, que tem quebrado paradigmas importantes na indução da inflamação de origem inata e adquirida.

1.1 Eixo SDF-1 α /CXCR4

Os neutrófilos são células produzidas na medula óssea, no compartimento celular hematopoiético, o qual é suprido principalmente por sinusóides venosos. A homeostasia do número de neutrófilos é mantida pelo equilíbrio entre a granulopoiese, armazenamento na medula óssea e mobilização deste compartimento para o sangue, marginação intravascular e *clearance* em diferentes tecidos. A produção e diferenciação de granulócitos são altamente reguladas pela secreção de fatores de transcrição mielóides, com diferenciação a partir de uma célula progenitora comum (ATHENS, 1963). A população de neutrófilos na medula óssea pode ser subdividida em três conjuntos: *pool* de células progenitoras hematopoiéticas, *pool* mitótico e *pool* pós-mitótico. O *pool* de células progenitoras hematopoiéticas é constituído por células progenitoras indiferenciadas, o *pool* mitótico refere-se à população comprometida com a série granulocítica e o *pool* pós-mitótico é composto por neutrófilos maduros, o que gera a reserva de células na medula óssea disponível para a liberação (ATHENS et al., 1961; DANCEY et al., 1976; BUGL et al., 2012). Em condições de homeostasia, para os neutrófilos maduros atingirem o sangue periférico, estes precisam migrar através do endotélio sinusoidal, o qual separa o compartimento medular do sangue periférico, por mecanismo único, transcelular (CAMPBELL, 1972; WEISS, 1970; BURDON et al., 2008, DIMASI et al., 2013). Na vigência de inflamação, todo o processo de recrutamento leucocitário é exacerbado. Após os neutrófilos desempenharem sua função, entram em apoptose, e a remoção destes neutrófilos apoptóticos é importante para a resolução do processo inflamatório (FADOK et al., 1998; LEE & SURH, 2012; RECCHIUTI, 2013). Neste contexto, tem sido bem caracterizado o *clearance* de neutrófilos apoptóticos por fagocitose em um processo não flogístico, denominado eferocitose por macrófagos residentes (SAVILL et al., 1989; FADOK et al., 1998; BURDON et al., 2005; RECCHIUTI, 2013). No entanto, em condições homeostáticas, o assunto tem sido pouco explorado.

O tráfego de leucócitos entre os diferentes compartimentos em condição de homeostasia é altamente regulado e envolve inúmeras sinalizações celulares e moleculares. Moepps et al. (2000), Lapidot & Kollet (2002), Kucia et al. (2004), Domanska et al. (2013) mostraram evidências da participação da α -quimiocina produzida pelas células estromais, SDF-1 α e do receptor CXCR4 na retenção de células imaturas e *homing* das células senescentes para a medula óssea. Martin et al. (2003) mostraram que neutrófilos maduros na medula óssea possuem baixos níveis de CXCR4 expressos na membrana, porém detectáveis. Interessantemente, essas células apresentam altos níveis intracelulares deste receptor, sugerindo que este é expresso na superfície celular e rapidamente internalizado por níveis altos de SDF-1 α no ambiente da medula óssea (FURZE & RANKIN, 2008a; 2008b). Tem sido proposto que neutrófilos senescentes na corrente sanguínea apresentam redução progressiva na expressão de receptores quimiotáticos, como o CXCR2, e aumento na expressão de CXCR4. Logo, com maior habilidade de responder a SDF-1 α presente na medula óssea e em órgãos de *clearance*, como o baço, os neutrófilos senescentes retornam a estes tecidos via eixo SDF-1 α /CXCR4 (FURZE & RANKIN, 2008a; 2008b; DOMANSKA et al., 2013). Assim, foi proposto um modelo no qual os macrófagos residentes no estroma da medula óssea seriam as células responsáveis pela remoção de aproximadamente 30% dos neutrófilos senescentes que ao voltarem à medula óssea, tornam-se apoptóticos. Nesta condição, os macrófagos secretam concentrações elevadas de G-CSF, estimulando assim a granulopoiese (Figura 1) (MARTIN et al., 2003; FURZE & RANKIN, 2008a; PITCHFORD et al., 2009).

Figura 1. Mecanismo de produção, recrutamento e *clearance* de neutrófilos na medula óssea em condições de homeostasia.



Fonte: Modificado de Furze & Rankin (2008).

Até o ano de 2005, a literatura mostrava que o SDF-1 α ligava-se exclusivamente ao receptor CXCR4, porém neste mesmo ano foi mostrado que esta quimiocina é capaz de ligar-se ao receptor RDC1, hoje denominado como CXCR7 (BALABANIAN et al., 2005). O receptor CXCR7 é altamente expresso no coração, cérebro, baço, rins, pulmões, testículos, ovário, tireoide, placenta humana, (EVA & SPRENGEL, 1993; LIBERT et al., 1998; BURNS et al., 2006; TRIPATHI et al., 2009), bem como em linfócitos e granulócitos na medula óssea e monócitos, granulócitos e plaquetas no sangue periférico (TARNOWSKI et al., 2010), e está envolvido na quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular. No entanto, os dados da literatura que reportam estes efeitos são controversos e preliminares (SÁNCHEZ-MARTÍN et al., 2013).

Diferentemente do receptor CXCR7, que também é ligante de CXCL11, o receptor CXCR4 tem como único ligante o SDF-1 α , sugerindo que o eixo SDF-1 α /CXCR4 pode desempenhar papel biológico importante. CXCR4 é um receptor de membrana acoplado a proteína G e é expresso por neutrófilos, progenitores CD34⁺, megacariócitos, plaquetas, linfócitos B, linfócitos T e células mononucleares

fagocíticas (MARTIN et al., 2003; MARTIN et al., 2006). Este receptor é extremamente importante para homeostasia, uma vez que a deleção embrionária deste receptor é letal. Entretanto, em animais nocautes para SDF-1 α foi evidenciado que o eixo SDF-1 α /CXCR4 não é o único sistema de *clearance* de neutrófilos, porém parece ser muito relevante, já que o transplante de células mielóides CXCR4^{-/-}, em animais selvagens, acarretou diminuição do *homing* para a medula óssea (MA et al., 1998; EASH et al., 2009).

A importância da expressão de CXCR4 na mobilização de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico tem sido mostrada em diferentes condições: a administração do antagonista de CXCR4 em camundongos ou em humanos leva a um rápido aumento no número de neutrófilos no sangue periférico, mostrando que o SDF-1 α atua como um fator de retenção de neutrófilos na medula óssea (MARTIN et al., 2003; HENDRIX et al., 2004); este dado também foi obtido em animais nocautes para este receptor na linhagem de células mielóides, os quais apresentaram neutrofilia, com liberação de células mielóides imaturas da medula óssea (MA et al., 1998; EASH et al., 2009); pacientes portadores da síndrome autossômica recessiva WHIM, denominada pelas suas principais manifestações - *Human Papillomavirus Virus (HPV) induced Warts, Hypogammaglobulinemia, bacterial Infections, and the pathognomonic Myelokathexis*, cuja gênese está ligada à persistente expressão gênica de CXCR4, apresentam neutropenia associada à retenção de neutrófilos senescentes na medula óssea. Este mecanismo está associado ao quadro de infecções recorrentes e graves nestes indivíduos (BACHELERIE, 2010).

Em conjunto, os dados apresentados acima mostram evidências importantes sobre a participação do eixo SDF-1 α /CXCR4 no tráfego de neutrófilos no organismo. Considerando a relevância dos neutrófilos na homeostasia e resposta à agressão, a investigação da modulação deste eixo contribuirá para compreensão da gênese de doenças de origens inflamatórias.

1.2 Eixo IL-17/IL-23/G-CSF

O eixo das IL-17/IL-23/G-CSF participa na gênese e na resolução do processo inflamatório (GORDY et al., 2011). Em resposta aos estímulos inflamatórios, macrófagos e células dendríticas produzem IL-23, que estimula

secreção de IL-17 por células Th17 que, por sua vez, conduz a níveis elevados de G-CSF e, conseqüentemente, ao aumento da granulopoiese (LEY et al., 2006). No entanto, foi mostrado primeiramente por Fadok et al. (1998) que macrófagos presentes em tecidos inflamados, com exceção da medula óssea, regulam negativamente a produção do G-CSF e de quimiocinas após a fagocitose de células apoptóticas, promovendo diminuição na resposta imune e aumento da resolução do processo inflamatório. Posteriormente, uma série de experimentos realizados por Stark et al. (2005) mostrou que a ingestão de neutrófilos apoptóticos por macrófagos teciduais inicia uma cascata de secreção de citocinas que, associadas, regula a produção e liberação de neutrófilos. Especificamente, após a ingestão do agente lesivo, a secreção de IL-23 é reduzida por macrófago, suprimindo a expressão de IL-17 por subtipos de linfócitos T teciduais. Esta redução de IL-17 resulta na diminuição sistêmica de G-CSF que, conseqüentemente, reduz a granulopoiese na medula óssea (LAAN et al., 1999; WITOWSKI et al., 2000; YE et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2003). Desta forma, este é um mecanismo precursor da fase de resolução do processo inflamatório (STARK et al., 2005).

A regulação da granulopoiese pela IL-17 é modulada pela secreção de IL-6, GM-CSF e G-CSF por células hematopoiéticas e células mesenquimais, levando a produção e diferenciação destas no compartimento medular. Adicionalmente, Krstic et al. (2012) mostraram que a IL-17 não provoca nenhuma alteração significativa nas diferentes atividades funcionais dos granulócitos no sangue periférico de indivíduos normais, sugerindo, portanto, que a IL-17 não possui capacidade pró-inflamatória neste estágio de maturação granulocítica.

Do exposto fica evidente que os mecanismos que controlam a mobilização de neutrófilos para o sangue em condições homeostáticas e de inflamação são complexos, não totalmente esclarecidos e dependentes de inúmeros mediadores químicos e receptores intracelulares e de membrana (URQUHART et al., 2007). Nos últimos anos, progressos significativos na compreensão destes mecanismos têm sido apresentados e têm evidenciado a importância de mediadores secretados não só no compartimento medular, mas também a participação marcante de células secretoras de citocinas nos compartimentos circulatórios e teciduais.

1.3 Moléculas de Adesão

O recrutamento de leucócitos do sangue periférico para o tecido inflamado é mediada por uma cascata de eventos bem definida, que se inicia com a captação de leucócitos circulantes, seguindo para o *rolling*, adesão às células endoteliais e, finalmente, a migração para o foco inflamatório (HERTER & ZARBOCK, 2013). Todos estes eventos citados acima envolvem a participação de moléculas de adesão, as quais já estão bem estabelecidas na literatura (LEY et al., 2007; HERTER & ZARBOCK, 2013). A relevância das moléculas de adesão no tráfego de leucócitos para o tecido inflamado é demonstrada em humanos portadores de defeitos genéticos na biossíntese de CD18, cadeia que compõe as beta 2 integrinas em leucócitos e medeia a adesão à parede vascular. Estes indivíduos apresentam deficiência de adesão leucocitária, neutrofilia, mas com escassez de neutrófilos no foco inflamatório (ETZIONI, 2009).

Diferentemente da participação das moléculas de adesão no tráfego de leucócitos circulantes do sangue para os tecidos inflamados, que está muito bem estabelecida, é pouco conhecido o papel das moléculas de adesão no endotélio sinusoidal e em neutrófilos egressos da medula óssea. Adicionalmente, os dados apresentados na literatura são controversos (LARANGEIRA et al., 2001; BURDON et al., 2005; HERTER & ZARBOCK, 2013).

O endotélio sinusoidal da medula óssea expressa moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1, CD62P e CD62E as quais medeiam a retenção e distribuição de células hematopoiéticas, especialmente de células progenitoras (SIMMONS et al., 1992; SCHWEITZER et al., 1996; VOERMANS et al., 2000; DIMITROFF et al., 2001; PETTY et al., 2009). Os neutrófilos presentes na medula óssea e recém-migrados também expressam uma variedade de moléculas de adesão. Dados da literatura mostram que a expressão de VLA-4, um dos principais ligantes para VCAM-1, é aumentada em neutrófilos recém-migrados da medula óssea. No entanto, a deleção de VLA-4 em células hematopoiéticas não altera o tráfego de neutrófilos, sugerindo que a expressão de VLA-4 é dispensável na liberação de neutrófilos da medula para o sangue periférico (SCOTT et al., 2003). A CD18 é altamente expressa em neutrófilos da medula óssea, no entanto a sua participação na migração de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico parece não ser relevante

(LARANGEIRA et al., 2001; BURDON et al., 2005). Apesar de animais nocautes para CD18 apresentarem neutrofilia, vários estudos demonstraram que este efeito é secundário, e acontece devido à incapacidade de neutrófilos nocautes para CD18 migrarem para o tecido, o que promove aumento nas secreções de IL-17 e G-CSF, que, como já descrito, estimulam a granulopoiese e liberação de neutrófilos da medula óssea (DAY & LINK, 2012). Da mesma forma que para CD18, os dados sobre a participação de CD62L no processo ainda é controverso. Foi proposto que a CD62L, expressa em neutrófilos e mediadora do comportamento *rolling*, é clivada nas células polimorfonucleares enquanto os leucócitos se movem do compartimento hematopoiético para o sinusóide venoso da medula óssea, controlando a distribuição de polimorfonucleares (ROGOWSKI et al., 1998; KASSIRER et al., 1999). Associados, estes dados sugerem que a CD62L atua como um sinal de retenção para os neutrófilos da medula (DAY & LINK, 2012). Por outro lado, foi demonstrado que a inibição da atividade da enzima responsável pela clivagem da CD62L, uma metaloprotease de membrana, não modificou a migração de neutrófilos da medula óssea (BURDON et al., 2005). Adicionalmente, animais deficientes de CD62L apresentam tráfego de neutrófilos normal entre os compartimentos medula óssea e sangue periférico (ROBINSON et al., 1999; ARBONÉS et al., 1994), demonstrando, assim, que a CD62L não é essencial para migração de células entre os compartimentos medula óssea e sangue periférico.

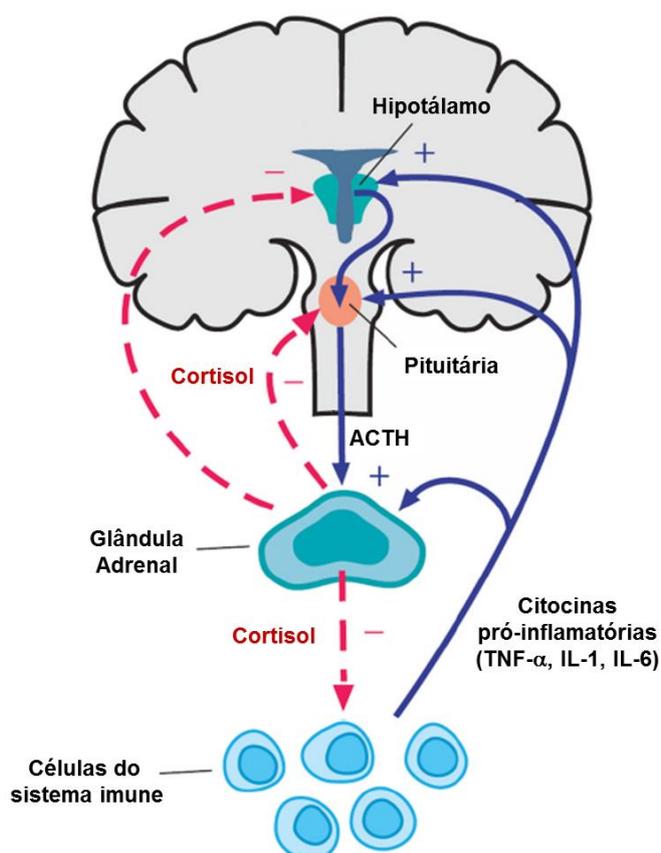
Com base na incipiência de dados na literatura, estudos complementares são necessários para o esclarecimento da participação das moléculas de adesão na mobilização neutrofílica da medula óssea para o sangue periférico.

1.4 Glicocorticóides e anexina-A1

Contribuindo para complexidade da produção e mobilização dos neutrófilos descrita acima, o processo é, ainda, controlado por moduladores endógenos, secretados em condições de homeostasia e inflamação. Neste contexto, o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, mais particularmente a glândula adrenal, constitui uma via do sistema endócrino dos mamíferos neste processo. A principal função do córtex adrenal é a produção de GCe e mineralocorticóides a partir de colesterol, sob influência do ACTH (Figura 2). Em circunstâncias normais, sua atividade é

fortemente regulada, com mudanças na secreção dos GCs, de acordo com o ritmo circadiano e em condições de estresse (JOHN et al., 2007). Os hormônios adrenais desempenham papel importante na resposta ao estresse e na homeostasia (MCEWEN, 2007). Os GCs modulam várias funções metabólicas, imunológicas e inflamatórias, sendo muito bem demonstrada a modulação endógena dos GC sobre a inflamação e a potente ação farmacológica dos compostos sintéticos, sendo que estes últimos são amplamente empregados na clínica médica (KIRWAN, 1995; MAKRYGIANNAKIS et al., 2006).

Figura 2. Comunicação bidirecional entre o sistema imune e o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal.



Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, estimulam a liberação de GC por atuarem nos três níveis do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (linhas azuis). Contrariamente, os GCs regulam negativamente o sistema imune com a supressão da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (linha tracejada vermelha).

Fonte: adaptado de Silverman & Sternberg (2012).

No processo inflamatório, os GCs modulam os diferentes eventos envolvidos no processo, como a quimiotaxia, fagocitose, permeabilidade vascular, expressão de

moléculas de adesão (FILEP et al., 1997; NAKAGAWA et al., 1999; TORSTEINSDOTTIR et al., 1999; WEBER et al., 2004, CAVALCANTI et al., 2006; 2007; GENEDANI et al., 2008); a mobilização de neutrófilos, secreção de mediadores químicos, entre outros (FLOWER et al., 1986; MORAES et al., 1987; ABE et al., 1995; ROVAI et al., 1998; LEECH et al., 2000; GENEDANI et al., 2008). Os GCs e outros hormônios esteroides modulam a resposta imune adaptativa, como por exemplo, indução de apoptose em células T e mudança de resposta celular de Th1 para Th2, com alteração no perfil de citocinas secretadas (BUTTS et al., 2011).

A concentração intracelular de GC não depende somente da concentração extracelular disponível, mas sim do metabolismo local dos GCs, o que determina a concentração intracelular de esteroides. A biodisponibilidade de GC biologicamente ativo é controlada pela 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (11HSD), a qual possui duas isoformas 11HSD1 e 11HSD2. A isoforma 11HSD2 age exclusivamente como uma desidrogenase, a qual converte o GC biologicamente ativo, o cortisol e a corticosterona, em derivados inativos 11-oxo derivado, cortisona e 11-deidrocorticosterona, respectivamente, enquanto a 11HSD1 predominantemente medeia a redução do 11-oxo derivado (DRAPER & STEWART, 2005).

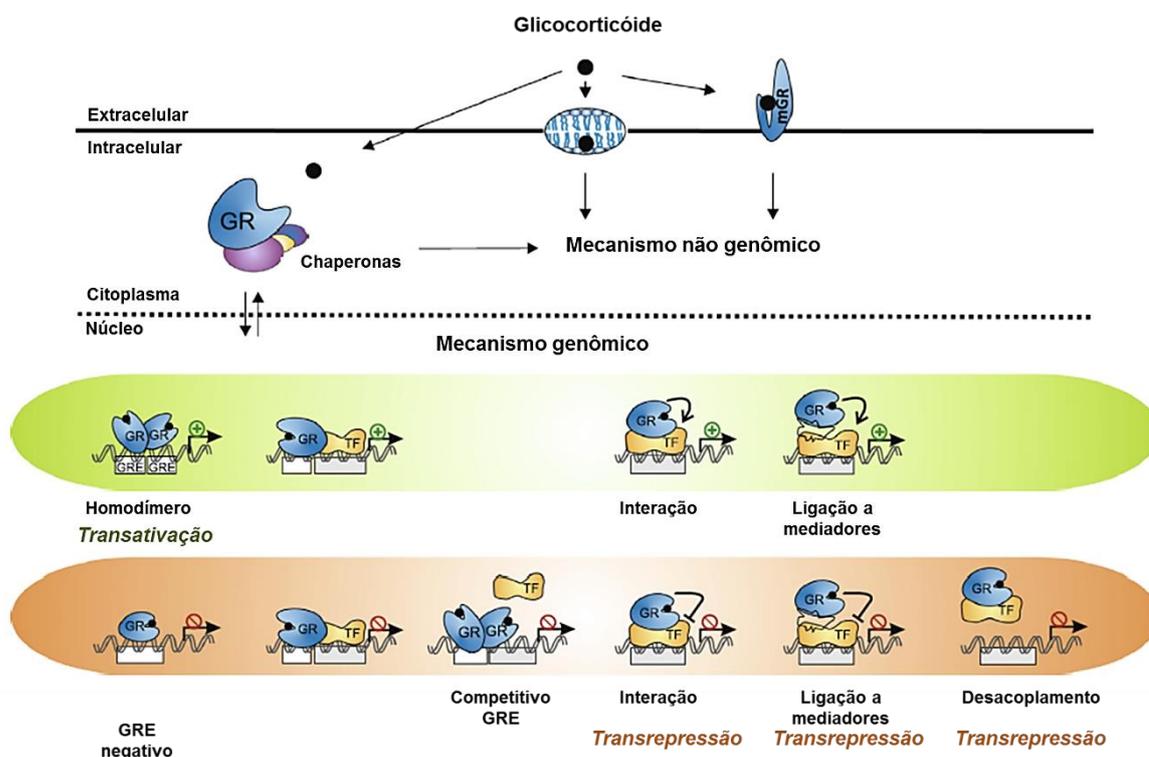
O receptor citoplasmático de glicocorticóide (NR3C1, GR) é um receptor nuclear pertencente à superfamília de receptores de hormônios/esteroides. Até o momento, está bem descrito que os efeitos anti-inflamatórios dos GCe (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) e sintéticos são mediados pelo GR, apesar de haver descrições de interações hormonais com as membranas celulares, quer sejam por interações físicas ou por receptores recém descritos, ou mesmo por ações intracelulares não dependentes de transcrição gênica (ALMAWI & MELEMEDJIAN, 2002; DE BOSSCHER et al., 2010; RATMAN et al., 2013). O GR é um complexo de multi proteínas, contendo diversas proteínas do tipo heat-shock (Hsp), como Hsp90, Hsp70, Hsp56 e Hsp40, além das imunofilinas, proteínas chaperonas (como p23 e Src) e diversas quinases (ex. MAPK) sinalizam o sistema (CAVALCANTI et al., 2007; STAHN, 2007). O GR consiste de três domínios diferentes com várias funções: um domínio N-terminal, um domínio ligado ao DNA e um domínio carboxi-terminal responsável pela ligação ao hormônio. O *splicing* alternativo do gene que transcreve o GR gera várias variantes deste receptor, sendo a isoforma GR α a variante mais expressa e a isoforma GR β a variante de menor expressão. A isoforma GR β apresenta uma alteração no domínio carboxi-terminal da proteína de modo que se

torna incapaz de ligar-se GCs. No entanto, GR β retém a capacidade de ligar-se ao DNA e tem sido demonstrado que atua como um inibidor negativo da isoforma dominante GR α . Assim, visto que a maioria dos efeitos dos GCs é exercida através do GR α , a partir deste ponto os mecanismos e efeitos descritos são referentes a esta isoforma (DE CASTRO et al., 1996; OAKLEY et al., 1999; YUDT et al., 2003). Após a ligação do agonista ao receptor, ocorre o desacoplamento das proteínas ligadas ao receptor e o complexo hormônio-receptor é translocado para o núcleo, onde se liga a sequências específicas do DNA, denominadas GREs (ALMAWI & MELEMEDJIAN, 2002; LU & CIDLOWSKI, 2004). Até então, a ativação gênica pelo GR era descrita como a ligação de um homodímero aos GREs, porém recentemente foi demonstrado que a ligação do complexo GC-GR aos GREs necessita de um fator transcripcional adjacente formando um complexo com os GREs (NIXON et al., 2012). A ligação do GC-GR aos GREs resulta na indução de síntese de mediadores anti-inflamatórios, como a ANXA1, I κ B α , DUSP-1, GILZ, além de proteínas regulatórias importantes para o metabolismo, como as enzimas envolvidas na gliconeogênese. Este mecanismo de ativação do GR e, conseqüente, síntese de proteínas é denominado de “transativação” e tem sido atribuído como um dos principais responsáveis pelos numerosos efeitos anti-inflamatórios dos GC (SCHÄCKE et al., 2002). Esta afirmação está baseada em trabalhos experimentais que empregaram o antagonista do GR, o RU-38486, que impede a ligação do agonista ao receptor e de inibidores da transcrição gênica abolindo os efeitos genômicos dos GC (LUI et al., 2005; LONG et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2007; GREGORY et al. 2009). A via alternativa de mecanismo genômico dos GCs é a inibição da transcrição de genes, a qual é chamada de “transrepressão” e baseia-se na interação física do GR com GRE negativos ou fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1, CREB, NF-AT, STAT6, IRF3, STAT3, GATA-3 e t-Bet, que inibem a expressão gênica de mediadores inflamatórios (SAKAI et al., 1988). No entanto, o exato papel dos GREs negativos na mediação dos efeitos dos GCs não está bem esclarecido. Sabe-se que monômeros do complexo GC/GR interagem direta ou indiretamente com fatores de transcrição; o complexo pode desacoplar o fator de transcrição de GRE negativo; e pode ocorrer a competição entre GC/GR e o fator de transcrição ou co-ativadores nucleares (Figura 3) (SILVERMAN & STERNBERG, 2012; RATMAN et al., 2013; OAKLEY et al., 2013). Neste contexto, os GCs inibem a

translocação nuclear e a função de fatores de transcrição suprimindo a síntese de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e prostaglandinas.

Outros mecanismos de interesse que contribuem para a ação dos GCs são os mecanismos de ação não genômicos, que inclui a regulação da MAPK, a interação direta com a membrana de forma independente à ligação ao GR e através da ligação ao GR localizado na membrana, os quais induzem efeitos anti-inflamatórios rápidos (Figura 3) (SONG & BUTTGEREIT, 2006; LÖWENBERG et al., 2007; STREHL et al., 2011). Estes mecanismos são necessários para a indução de uma rápida resposta ao estresse (GROENEWEG et al., 2012).

Figura 3. Mecanismos de ação dos glicocorticóides.



Fonte: Adaptado de Ratman et al. (2013).

O nosso grupo de pesquisa mostrou que os GCs modulam a migração dos neutrófilos em condições basais e em processos inflamatórios, por interferir, pelo menos em parte, na interação leucócito-endotélio e na expressão de moléculas de adesão envolvidas neste processo por meio de mecanismo mediado pelo receptor citosólico (FARSKY et al., 1995; CAVALCANTI et al., 2006; 2007). Mais recentemente, temos mostrado a participação da ANXA1, que como já descrito, é

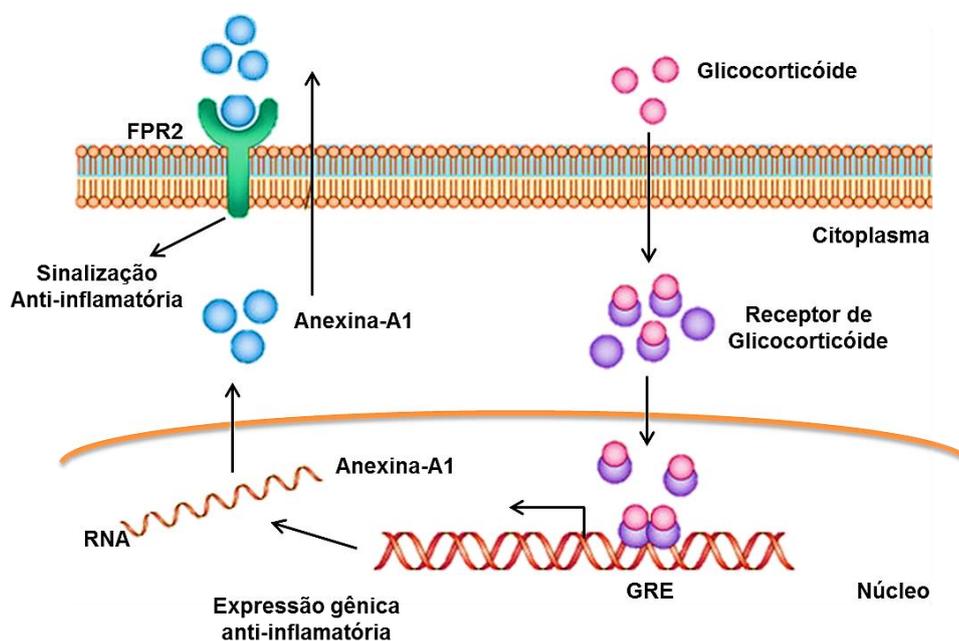
uma proteína secretada por alguns tipos celulares, entre os quais os neutrófilos, após estimulação pelos GC, no tráfego de neutrófilos entre a medula e o sangue (DALLI et al., 2012a).

Em 1972, Flower et al. mostraram que de todos os anti-inflamatórios, somente os não esteroidais eram capazes de bloquear a produção de prostaglandinas em um sistema sem a presença de células. Apesar dos GCs constituírem a classe de anti-inflamatórios mais potentes, eram completamente inativos neste sistema. No entanto, logo surgiram trabalhos que mostraram que os GCs inibiam a secreção de prostaglandinas. Assim, surgiu o questionamento de qual mecanismo estaria envolvido na ação dos GCs e, adicionalmente, neste mesmo trabalho, foi lançado o conceito de que o efeito dos GCs era dependente de transcrição gênica e síntese de proteína, e que estes fármacos não possuíam uma ação direta. Logo mais tarde, Blackwell et al. (1980) mostram que a ação dos GCs ocorria via um segundo mensageiro, a macrocortina, a qual inibia a PLA2. Em 1986, Pepinsky et al. caracterizam a estrutura, expressão gênica e proteica da lipocortina 1. Outras moléculas com estrutura e atividades biológicas semelhantes foram relatadas por outros laboratórios, como a renomodulina e a lipomodulina, porém ao longo dos estudos e, em comparação com a lipocortina 1, constataram que todas as moléculas eram estruturalmente ou imunologicamente relacionadas (DI ROSA et al., 1984). Assim, para haver um consenso geral entre os grupos envolvidos, CRUMPTON & DEDMAN (1990), com base em todos os estudos realizados determinaram a renomeação da molécula em questão para ANXA1.

ANXA1 é uma proteína de 37 kDa e membro da superfamília das proteínas anexina que se ligam com alta afinidade em fosfolipídios na presença de Ca^{++} . As anexinas são caracterizadas estruturalmente por dois domínios: uma pequena região N-terminal, variando em comprimento e composição, e um domínio central, C-terminal, formado por quatro ou oito dobras repetidas de uma sequência conservada de aproximadamente 70 aminoácidos (RAYNAL & POLLARD, 1994). Existem 13 proteínas anexinas identificadas em mamíferos, e cada uma possui funções biológicas específicas (GERKE et al., 2005). A síntese da ANXA1 é regulada principalmente pelos GCs, e é uma proteína importante na ação anti-inflamatória dos GC, inclusive dos GCe (Figura 4) (WEIN et al., 2004; SOLITO et al., 2006; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009). Em condições basais, ANXA1 é encontrada no citoplasma de neutrófilos, macrófagos e monócitos de humanos e murinos. Já em

condições de ativação celular, a ANXA1 é rapidamente mobilizada do citoplasma para a membrana, sendo secretada. O mecanismo envolvido na rápida externalização da ANXA1 é dependente do tipo celular envolvido, no caso de neutrófilos humanos, mais de 60% da quantidade de ANXA1 citoplasmática é armazenada em grânulos de gelatinase, os quais podem ser rapidamente mobilizados para a membrana quando a célula é exposta a um quimioatraente ou durante a adesão ao endotélio vascular ativado (PERRETTI et al., 1996; VONG et al., 2007). A ANXA1 liga-se a um receptor de sete domínios transmembrana acoplado a proteína G, o FPR2 (*formyl peptide receptor 2*, também conhecido como ALXR em humanos), que também é o receptor para a molécula anti-inflamatória lipoxina A4. A ANXA1 pode atuar de forma autócrina, parácrina e justacrina, sendo esta última o mecanismo mais plausível da ação desta proteína em condições inflamatórias (MORAND et al., 1995; PERRETTI, et al., 2000; MULLA, et al., 2005).

Figura 4. Via de indução de expressão de ANXA1 pelos GCs.

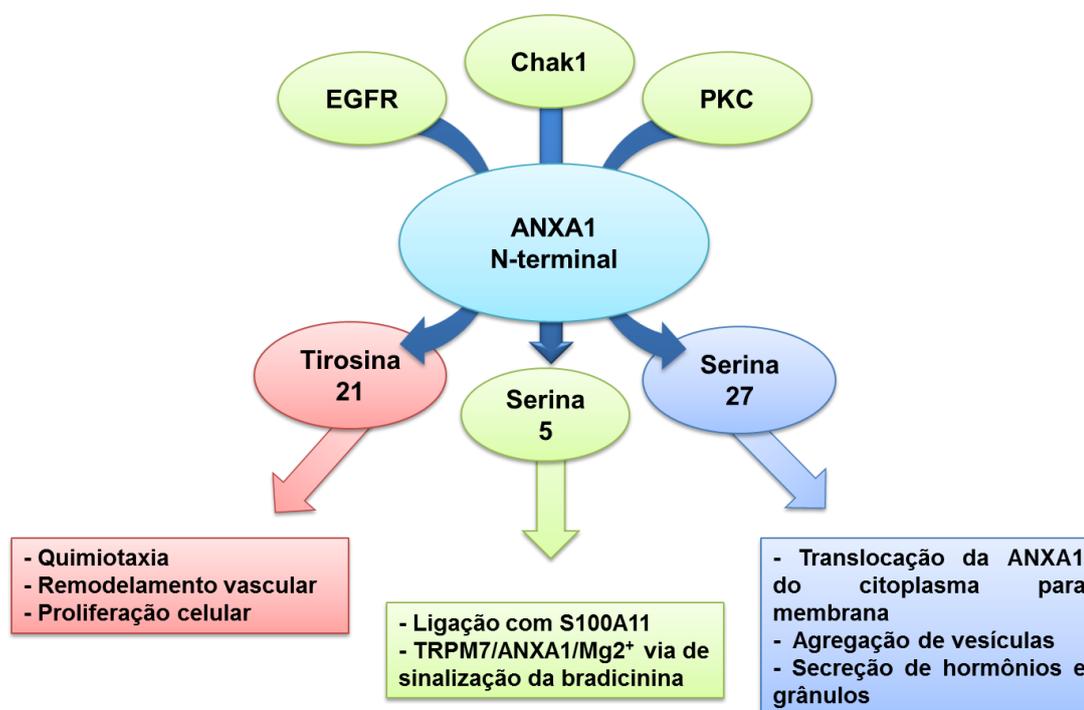


Fonte: Modificado de Yang et al. (2013)

Estudos utilizando diferentes modelos experimentais de inflamação têm demonstrado que a administração de ANXA1 ou seus peptídeos biologicamente ativos (ex. Ac2-26, Ac2-12 e Ac1-188), que possuem a região N-terminal, resulta na potente inibição da migração de neutrófilos para o foco inflamatório, bem como a secreção de mediadores inflamatórios (CIRINO et al., 1989; PERRETTI & FLOWER, 1993; PERRETTI & FLOWER, 2004; LIM & PERVAIZ, 2007; GIROL et al., 2013).

Estes efeitos observados *in vivo* foram comprovados por análises *in vitro*, as quais mostraram que a ANXA1 ou peptídeos bioativos derivados inibiram a aderência de neutrófilos e a transmigração através de monocamadas de células endoteliais (WALTHER et al., 2000; ZOUKI et al., 2000; HAYHOE et al., 2006). A atuação da ANXA1 está relacionada a sua capacidade de interagir com as membranas celulares, por mecanismo justácrino, como citado anteriormente. Esta interação é reversível e regulada especialmente por modificações pós-translacionais, como a fosforilação, principalmente, da porção N-terminal (SCHLAEPFER & HAIGLER, 1987). PEPINSKY & SINCLAIR (1986) descreveram a fosforilação da ANXA1 próximo à região N-terminal, no resíduo tirosina 21 pela proteína tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R), o que está relacionado com quimiotaxia, remodelamento vascular e proliferação vascular (Figura 5) (FARKAS et al., 1994; DE COUPADE et al., 2000; CROXTALL et al., 2000; JOHN et al., 2004). Foi também demonstrado que a ANXA1 é fosforilada pela proteína quinase C (PKC), nos resíduos treonina 41, treonina 24, serina 28, mas principalmente no resíduo serina 27, o qual está relacionado com a translocação da ANXA1 do citoplasma para a membrana (SOLITO et al., 2003), secreção de hormônios (JOHN et al., 2004) e agregação de vesículas (Figura 5) (WANG & CREUTZ, 1992). Ainda, a ANXA1 também é fosforilada pela PKA no resíduo treonina 216, porém esta fosforilação ocorre na região C-terminal (SCHLAEPFER & HAIGLER, 1988; VARTICOVSKI et al., 1988). Em 2004, uma nova proteína quinase envolvida na fosforilação ANXA1 foi identificada por Dorovkov & Ryazanov, a proteína quinase do canal receptor de potencial transiente M7 (TRPM7 - Chak1), a qual é responsável pela fosforilação do resíduo serina 5 (Figura 5). Um estudo caracterizou o complexo TRPM7/ANXA1/Mg⁺⁺ como uma nova via de sinalização da bradicinina, porém esta via não está completamente elucidada. Adicionalmente a este estudo, o resíduo serina 5 possui um papel crucial na translocação da ANXA1 para a membrana por facilitar a ligação da ANXA1 à proteína ligante de cálcio (S100A11) (CALLERA et al., 2009; DOROVKOV et al., 2011).

Figura 5. Principais efeitos da fosforilação ANXA1 nos resíduos caracterizados.



Fonte: Modificado de D'Acunto et al. (2013).

As propriedades anti-inflamatórias da ANXA1 estão relacionadas à inibição da PLA2. Solito et al. (1998) confirmaram a relação entre a ANXA1 endógena e a PLA2 por meio de ensaios realizados com a linhagem de monócitos U-937, os quais foram transfectados com o cDNA *sense* e *antisense* para a ANXA1. As células transfectadas com o clone *antisense* apresentaram uma alta atividade à PLA2 e baixa expressão da ANXA1 quando comparadas àquelas transfectadas com o clone *sense*. A inibição da PLA2 implica no bloqueio da síntese de mediadores inflamatórios lipídicos e na regulação do processo inflamatório (PARENTE & SOLITO, 2004; YAZID et al., 2012). Outras enzimas envolvidas na inflamação, além de PLA2, são reguladas pela ação da ANXA1 na vigência de um processo inflamatório. Wu et al. (1995) demonstraram que a administração de um anticorpo policlonal contra a proteína ANXA1 bloqueou a inibição da iNOS, responsável pela produção de NO, em ratos com septicemia tratados com dexametasona. Além disso, a dexametasona e o peptídeo biologicamente ativo (Ac2-26) inibiram a indução de iNOS em macrófagos estimulados com LPS. A dexametasona também inibiu a

indução da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e a administração do anticorpo anti-ANXA1 não aboliu este efeito. Assim, a dexametasona inibe a iNOS via ANXA1, porém a inibição da COX-2 ocorre independentemente da ANXA1.

Alguns dos efeitos anti-inflamatórios da ANXA1 podem ser mediados pela liberação de interleucina 10 (IL-10) (FERLAZZO et al., 2003). Os resultados mostraram que em macrófagos estimulados com LPS e tratados com ANXA1 recombinante apresentaram aumento na secreção de IL-10, de forma dose-dependente. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir a expressão proteica e gênica da COX-2 (MERTZ et al., 1994) e iNOS (CUNHA et al., 1992) e, adicionalmente, inibe a produção de IL-12 (D'ANDREA et al., 1993). A inibição de IL-12 é mecanismo complementar da ação da ANXA1, já que proteína inibe a secreção de IL-2 e interferon- γ (IFN- γ) produzidos por células Th1 e macrófagos (D'ACQUISTO et al., 2007a; 2007b).

Já está bem estabelecida na literatura que uma das principais ações anti-inflamatórias dos GCs é a habilidade de inibir a migração dos leucócitos, sendo que este efeito é mediado tanto pela ANXA1, quanto pelos peptídeos bioativos gerados da porção N-terminal desta proteína, particularmente o Ac2-26. Estudos utilizando o modelo de isquemia/reperfusão mostraram o efeito protetor da ANXA1 e de seus peptídeos miméticos no dano no miocárdio dependente da migração de leucócitos (D'AMICO et al., 2000; LA et al., 2001) e, ainda, este efeito está relacionado a redução da atividade da mieloperoxidase e aos níveis de interleucina 1 β (IL-1 β). Walther et al. (2000) sugeriram que a porção N-terminal da ANXA1 e dos peptídeos bioativos da ANXA1 ligam ao FPR dos neutrófilos, o que desencadeia alterações na concentração de cálcio intracelular sem ativar a via da MAPK, dessensibilizando estas células a quimioatraentes e inibindo a transmigração endotelial (CHIANG & SERHAN, 2006). Esta hipótese foi confirmada, pois o tratamento farmacológico com BOC2, antagonista não seletivo de receptor FPR, aboliu o efeito inibidor da ANXA1 e dos peptídeos na migração de neutrófilos. Ainda, trabalhos utilizando a técnica de microscopia intravital mostram que animais deficientes de ANXA1 apresentam maior migração de neutrófilos frente ao zymosan (CHATTERJEE et al., 2005; YAZID et al., 2010), no entanto a administração de ANXA1 recombinante ou o peptídeo Ac2-26 em animais WT submetidos a isquemia/reperfusão ou LPS reverte o número de leucócitos aderidos e migrados (GAVINS et al., 2003; DUFTON et al., 2010; ALLCOCK et al., 2001; GAVINS et al., 2012). De fato, a ANXA1 altera a quimiotaxia

de neutrófilos por aumentar o influxo de Ca^{++} e induzir a clivagem de CD62L (SOLITO et al., 2003; DUFTON & PERRETTI, 2010).

Vários mecanismos contribuem para a resolução do processo inflamatório, entre eles, está a apoptose de células inflamatórias e a sua remoção do sítio inflamatório por macrófagos, o que leva a secreção de mediadores anti-inflamatórios (SAVILL, 1997; SAVILL et al., 2002; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). Os GCs e ANXA1 desempenham funções importantes nestes processos biológicos destinados a restaurar a homeostasia. De fato, a ANXA1 é um importante mediador na sinalização de *eat me* do neutrófilo apoptótico com os receptores no macrófago, sendo responsável, por exemplo, pela ligação da fosfatidil serina ao seu receptor (ARUR et al., 2003). Com base nestes dados, nosso grupo tem pesquisado os mecanismos moleculares e celulares dos GCe e ANXA1 envolvidos na modulação da migração de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico, e deste para o tecido em condições basais e inflamatórias. Recentemente, nós mostramos que em animais deficientes de ANXA1 ocorre acúmulo de neutrófilos CXCR4⁺ na medula óssea e que estes refletem neutrófilos senescentes que migraram do sangue para a medula e não foram eficientemente fagocitados por macrófagos medulares (DALLI et al., 2012a). Este último mostra que a ANXA1 pode ser uma proteína relevante para o controle do tráfego de neutrófilos da medula para o sangue e deste de volta para a medula, já que os dados apresentados acima foram obtidos em condições de homeostasia. Adicionalmente, animais geneticamente deficientes de ANXA1 apresentam números elevados de neutrófilos maduros na medula óssea e neutrofilia (DALLI et al., 2012a).

Do exposto acima fica evidente que o controle do tráfego de neutrófilos entre a medula e o sangue é complexo, ainda não totalmente esclarecido e que os GCe exercem papel neste processo. Nosso grupo tem contribuído para esta literatura, mostrando o envolvimento dos GCe, via ANXA1, na expressão de moléculas de adesão e, dados mais recentes sugerem a ação da ANXA1 sobre o eixo SDF-1 α /CXCR4.

2 OBJETIVOS

A literatura anteriormente foi descrita no sentido de contextualizar a importância dos neutrófilos nos diferentes compartimentos endógenos em processos que regulam a homeostasia e para a defesa do organismo ao trauma. A manutenção destes nos compartimentos é complexa, altamente mediada por substâncias endógenas. Neste contexto, se destacam o eixo HPA e a proteína ANXA1, secretada pelos GC. Assim, no presente trabalho foram investigadas as vias de controle do tráfego de neutrófilos da medula óssea, bem como o perfil molecular das células recrutadas para o sangue, a saber: 1) investigar o controle da proteína ANXA1 sobre o eixo SDF-1 α /CXCR4/CXCR2; 2) avaliar o perfil molecular de neutrófilos circulantes recrutados pela ação do ACTH; 3) verificar o papel da ANXA1 sobre o eixo IL-23/IL-17/G-CSF na vigência de inflamação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C *selvagens* (WT) machos pesando entre 25 e 35 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Adicionalmente foram empregados camundongos Balb/C nocautes machos para o gene de anexina-A1 (ANXA1^{-/-}), gerados a partir de matrizes gentilmente cedidas pelo Dr. Rod Flower (William Harvey Research Institute of London). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em salas com controle de temperatura (22-25 °C), umidade constante (60%) e ciclos controlados (claro/escuro 12 horas cada), tendo ração e água *ad libitum*. Anestesia (cloridrato de ketamina 77mg/kg/cloridrato de xilazina, 7mg/kg). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob nº CEUA/FCF/285), bem como foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio).

3.2 Tratamentos Farmacológicos

3.2.1 RU 38486

Os camundongos Balb/C WT foram tratados com um esteróide sintético (17β-hidroxi-11β-(4-dimetil-amino-fenil)-17α-(prop-1-enil)-estra-4,9-dien-3-on), nomeado de RU 38486. Esta substância apresenta alta afinidade pelos GR e progesterona atuando, exclusivamente, como antagonista dessas substâncias (MOGUILLEWSKY & PHILBERT, 1984). O RU 38486 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em uma mistura de salina isotônica, carboximetilcelulose (2 mg/mL em salina isotônica) e *tween* 80 (2 gts/mL da solução preparada).

Esta solução foi administrada por via intraperitoneal (10 mg/kg) nos camundongos WT 24 horas e 2 horas antes da administração do ACTH ou do LPS.

3.2.2 ACTH

Para induzir o aumento de GCE na circulação, foi empregado a administração i.p. de ACTH, segundo descrito por (HARRIS et al., 1995; LILES et al., 1997; WEBER et al., 2001, 2004). Os animais foram tratados com 5 µg de ACTH (Synacthen® Depot, Novartis, Basel, Switzerland), em dose única, via i.p., duas horas após a última injeção de RU 38486. O ACTH foi dissolvido em uma solução de tampão fosfato salina (PBS; NaCl 125mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 8mM, NaH₂PO₄ 2mM). Animais do grupo controle receberam volume idêntico do veículo utilizado na solubilização do ACTH, pela mesma via de administração. Quatro horas mais tarde da administração de ACTH ou do veículo, os animais foram anestesiados e as amostras de sangue e medula óssea foram coletadas.

3.2.3 BOC2

Os camundongos Balb/C selvagens foram tratados com N-t-butiloxicarbonil-Fe-Fe-Dleu-Dleu-Fe, nomeado de BOC2, o qual foi gentilmente cedido pela Dra Sônia Maria Oliani. Esta substância apresenta alta afinidade pelos receptores FPRs, exclusivamente, como antagonista não seletivo dessas substâncias (KHAU et al., 2011; GAVINS et al., 2012; GIROL et al., 2013). O BOC2 (ICN Pharmaceuticals, Basingstoke, U.K.) foi dissolvido em uma mistura de salina isotônica e etanol 10%. Esta solução foi administrada por via intraperitoneal (10 µg/animal) nos camundongos selvagens durante 4 dias, 1 vez ao dia. Este protocolo de tratamento foi baseado nos trabalhos de Gastardelo et al. (2009), Gavins et al. (2012) e Girol et al. (2013).

3.2.4 Ac2-26

Os camundongos Balb/C selvagens e nocautes para ANXA1 foram tratados com o peptídeo Ac2-26, o qual foi gentilmente cedido pela Dra Sônia Maria Oliani. Este peptídeo é a porção N-terminal efetora da proteína ANXA1, o qual desempenha a função anti-inflamatória em diferentes modelos testados (PERRETTI et al., 1993; PERRETTI & FLOWER, 1993; GIROL et al., 2013). O peptídeo Ac2-26 (China Peptides Co. L^{td}, Shanghai, CN) foi dissolvido em uma mistura de salina isotônica, a

qual foi administrada por via intraperitoneal (1 mg/kg) nos camundongos selvagens e ANXA1^{-/-} durante 4 dias, 1 vez ao dia. Este protocolo de tratamento foi baseado nos trabalhos de La et al. (2001), Teixeira et al. (2013) e Girol et al. (2013).

3.3 Indução da inflamação pelo LPS

O lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS, 100 µg/kg, i.p., *E. coli* ATC 026B6, Sigma Aldrich) foi dissolvido em solução tampão fosfato salina (PBS) e administrado via i.p.

3.4 Obtenção de amostras biológicas

3.4.1 Coleta de sangue circulante e medula óssea

O sangue circulante em condição não inflamatória foi obtido através da punção da aorta abdominal, porém em condição inflamatória o sangue circulante foi obtido através da secção da artéria subclávia exposta previamente, uma vez que o processo inflamatório foi induzido no peritônio inviabilizando a coleta pela artéria abdominal. O EDTA (Solução 2%; Sigma Aldrich) foi empregado como anticoagulante. Após a aquisição das células do sangue circulante, as células da medula óssea foram obtidas pela vivisseccção para retirada do fêmur, mantendo as epífises preservadas. Após a extração, as epífises foram removidas e o canal medular foi perfundido 3 vezes com 2 mL de meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando-se seringa de 1mL e agulha de calibre 26 mm. A suspensão celular foi transferida para tubos falcon, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantida em banho de gelo.

3.4.2 Coleta do lavado peritoneal

Os camundongos Balb/C selvagens foram tratados com RU 38486 ou veículo, conforme método descrito no item 3.2.1, e animais ANXA1^{-/-} ou Balb/C selvagens receberam 1mL de uma solução de LPS 100 µg/Kg, via i.p. Após um período de 4 horas, os animais foram anestesiados e eutanaziados. Posteriormente, 3 mL de PBS

foram injetados no peritônio. Essa suspensão foi coletada, centrifugada por 10 min a 4°C e 1500rpm. O sobrenadante obtido foi utilizado para posteriores análises.

3.5 Quantificação dos leucócitos nas amostras

O número total de células do sangue circulante, medula óssea e lavado peritoneal foi quantificado com auxílio da câmara de Neubauer, após diluição de 1:100 em Líquido de Türk. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço, os quais foram fixados em lâminas, corados com solução corante de May Grumwald-Giemsa modificada (ROSENFELD, 1947). Os esfregaços foram analisados em microscópio de luz (objetiva de 100X). A linhagem granulocítica da medula óssea foi classificada como sendo blástica, imatura, bastonete e madura. A classificação de células intermediárias incluiu promielócitos, mielócitos e metamielócitos. As células maduras, na última fase de maturação, corresponderam a 98-99% de neutrófilos. Na medula óssea, os linfoblastos foram classificados como blástica, já os linfócitos plasmócitos e macrófagos foram classificados como células maduras. No sangue circulante, células mononucleares foram nomeadas como linfócitos.

3.6 Expressão de ANXA1 por Western Blotting

Amostras do baço e estômago foram coletadas para quantificação de ANXA1, uma vez que estes tecidos apresentam expressões significativas desta proteína (HANNON et al., 2003). As amostras foram colocadas em tampão de lise (100 mM KCl, 3 mM NaCl, 3,5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (pH 7,4), e 1% Triton X-100) contendo inibidores de proteases e fosfatases. Os lisados foram centrifugados (16000 g, 10 min, 4°C) e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford. As proteínas foram desnaturadas pelo tampão de Laemmli (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.001%) e aquecidas por 5 min. Alíquotas correspondentes a 25 µg de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida a 12%, e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA), que foi bloqueada com tampão Tris-salina (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) contendo 0.1% Tween 20 (v/v) e 5% (v/v) de leite desnatado. Após lavagens, a

membrana foi incubada com anticorpo monoclonal de coelho anti-anexina-A1 (1:1000, v/v, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA) overnight. Para detecção do anticorpo primário foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG de coelho HRP-conjugado (1:3000, v/v, Abcam Products, San Francisco, CA, USA). As bandas imunorreativas foram reveladas utilizando sistema quimioluminescente (ECL, Amershan Biociences, San Francisco, CA, USA).

3.7 Citometria de fluxo para quantificação da expressão de CXCR4/CXCR2 e moléculas de adesão CD18, CD49d e CD62L

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a expressão de CXCR4, CXCR2, das moléculas de adesão (CD49d, CD18 e CD62L) nas membranas de células coletadas do sangue circulante e da medula óssea.

Os leucócitos foram isolados do sangue circulante e da medula óssea, conforme o item 3.4.1. O sangue foi coletado usando uma solução de EDTA 2% e o conteúdo da medula óssea foi colhido com meio DMEM. A lise dos eritrócitos foi realizada com cloreto de amônio (0,13 M) em ambas as amostras, os leucócitos foram recuperados após a lavagem com solução balanceada de Hanks (HBSS; GIBCO, Grand Island, NY, EUA). Após a lavagem, 1×10^6 leucócitos foram incubados com 100 μ L de anticorpos monoclonais anti-CXCR4 conjugado ao ficoeritrina (PE) (BD PharMingen Technical, CA, EUA), anti-CD62L (PE, BD PharMingen Technical), anti-CD49d conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD PharMingen Technical), anti-CD18 (FITC, BD PharMingen Technical) ou anti-CXCR2 (PE, R&D System, Minneapolis, MN, EUA). Todos os anticorpos foram diluídos a 1:100 em PBS, e as incubações foram realizadas por 20 min a 4° C, sob proteção de luz.

Imediatamente após as incubações, as análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton and Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, San Jose, CA, EUA) pelo software *FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland, TN, EUA). Os dados de 10.000 células foram obtidos, sendo considerados para análise os leucócitos com morfologia viável. Os resultados foram expressos como porcentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência (MFI).

3.8 Análise da maturação granulocítica

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a análise diferencial das células da medula óssea. Os leucócitos foram isolados da medula óssea, conforme o item 3.4.1., e recuperados após a lavagem com solução balanceada de Hanks (HBSS; GIBCO, Grand Island, NY, EUA).

A análise da maturação granulocítica foi realizada pela marcação fenotípica de três estágios da maturação granulocítica, a saber: células imaturas (promielócito e mielócito), células intermediárias (metamielócito e bastão) e neutrófilos maduros (neutrófilos segmentados). Os leucócitos foram incubados com anticorpos anti-Gr-1 (conjugado com PE, anti-mouse Ly6G, BD PharMingen Technical, CA, EUA) e anti-CD11b (conjugado com FITC, anti-mouse CD11b, BD PharMingen Technical, CA, EUA). Para separar os monócitos, as células foram marcadas com anti-mouse Ly6C (conjugado com APC, anti-mouse Ly6C, BD PharMingen Technical, CA, EUA). Os neutrófilos maduros foram marcados com Gr-1^{hi}/CD11b^{hi}, células intermediárias foram Gr-1^{hi}/CD11b^{med} e as células imaturas foram Gr-1^{med}/CD11b^{med/hi}.

Imediatamente após as incubações, as análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton and Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, San Jose, CA, EUA) pelo software *FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland, TN, EUA). Os dados de 10.000 células foram obtidos, sendo considerados para análise os leucócitos com morfologia viável. Os resultados foram expressão como porcentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência (IMF).

3.9 Expressão do receptor FPR2 em granulócitos da medula óssea e em neutrófilos circulantes

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a expressão do receptor FPR2 em granulócitos da medula óssea e em neutrófilos circulantes. Os leucócitos foram isolados do sangue circulante e da medula óssea, conforme o item 3.4.1. O sangue foi coletado usando uma solução de EDTA 2% e o conteúdo da medula óssea foi colhido com meio DMEM. A lise dos eritrócitos foi realizada com cloreto de amônio

(0,13 M) em ambas as amostras, os leucócitos foram recuperados após a lavagem com solução balanceada de Hanks (HBSS; GIBCO, Grand Island, NY, EUA).

Para determinação da expressão de FPR2 em cada estágio de maturação granulocítica, foi empregada a metodologia acima descrita e marcação com anti-FPR2 (Anticorpo primário goat anti-mouse 1:100, 1 h a 4°C) e anticorpo secundário conjugado com FITC (Rabbit anti-goat 1:200, 1 h a 4°C).

Imediatamente após as incubações, as análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton and Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, San Jose, CA, EUA) pelo software *FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland, TN, EUA). Os dados de 10.000 células foram obtidos, sendo considerados para análise os leucócitos com morfologia viável. Os resultados foram expressão como porcentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência (IMF).

3.10 Ensaio imunoenzimático

A quantificação de IL-17, IL-23, G-CSF, SDF-1 α e corticosterona foram realizadas no perfusato medular, soro e lavado peritoneal dos animais por ELISA. Essa metodologia é considerada como padrão ouro para esse tipo análise (CURNOW & MURRAY, 2006). Esta técnica utiliza kits comerciais e foi executada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante Cayman (Cayman, Ann Arbor, MI, EUA).

3.11 Quimiotaxia in vitro

Amostras de sangue total de animais tratados com veículo ou ACTH foram obtidas de acordo com o item 3.4.1, e os neutrófilos foram separados com solução de Percoll. O gradiente de Percoll foi montado pela lenta adição de 3 mL de Percoll 70% sobre 3 mL de Percoll a 60%, ambos diluídos com solução balanceada de Hanks (HBSS, GIBCO, Grand Island, NY, USA). Após este procedimento, 3 mL de sangue total foi adicionado lentamente sobre o gradiente de Percoll e, posteriormente, centrifugado a 500 x g por 35 min a 22 °C, com aceleração e desaceleração de 2m/s². Após a centrifugação, o halo formado entre as soluções de

Percoll 70% e 60%, contendo os neutrófilos, foi coletado. Os neutrófilos obtidos foram lavados 2 vezes com solução HBSS e centrifugados a 400 x g por 10 min a 22 °C. Após as lavagens, os neutrófilos foram ressuspensos na concentração de 2×10^5 céls/mL em HBSS suplementado com Ca^{++} . Os leucócitos da medula óssea foram coletados de acordo com o item 3.4.1, e ressuspensos na concentração de 6×10^6 céls/mL em HBSS, suplementado com Ca^{++} . No próximo passo, 25 μL da suspensão celular da medula óssea e do sangue periférico foram colocados sobre cada poço da placa de quimiotaxia com filtro de poro de 8 μm (Neuroprobe ChemoTx-101-8™, Neuroprobe, Leamington Spa, UK), a qual foi gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Ambrósio Fock. Como quimioatraentes foram empregados fMLP (10^{-6} M) ou SDF-1 α (1 ng/mL), os quais foram adicionados nos poços da parte inferior da placa de quimiotaxia. As placas de quimiotaxia com neutrófilos obtidos do sangue periférico foram incubados por 2 h e com a suspensão de leucócitos obtida da medula óssea foi incubada por 1 h a 37 °C, 5% CO_2 . Os neutrófilos do sangue migrados para o compartimento inferior da câmara de quimiotaxia foram contados em câmara de Neubauer e os neutrófilos da medula óssea migrados foram marcados com o anticorpo monoclonal anti-mouse-Gr1 (conjugado com PE, anti-mouse Ly6G, BD PharMingen Technical, CA, USA) e mensurados no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA).

3.12 Ensaio imunofluorescência

Leucócitos coletados do sangue periférico e medula óssea foram colocados sobre lâminas de vidro revestidas com gelatina 0,1%. Após 30 min, as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min, permeabilizadas com Tween-20 0,4% em PBS por 15 min, e os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de soro de cabra 3%, BSA 0,1% em PBS por 1 h. Após estes procedimentos, as células foram incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-ANXA1 (1:300; Invitrogen, Zymed Laboratories, Carlsbad, CA, USA) em PBS contendo 1,5% de soro de cabra, overnight a 4°C. Após três lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com PE (1:100, Abcam, London, UK) em PBS contendo 1,5% de soro de cabra por 1 h, em temperatura ambiente, na ausência de luz. As células foram lavadas com PBS e coradas com diamidinofenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, Saint

Louis, MO, USA), por 10 min. Após a coloração, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e, posteriormente, observadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Axioskop 2. A análise densitométrica de imunofluorescência da ANXA1 em neutrófilos foi realizada com uma escala arbitrária de 0 a 255, utilizando o software AxioVision.

3.13 Ensaio de fagocitose

As células da medula óssea foram obtidas conforme o item 3.4.1. Após a centrifugação (600 x g por 10 min), as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR). A suspensão celular (1×10^7 células/poço) foi incubada em placa de 24 poços, sobre lamínula de vidro redonda, *overnight*, 37°C com 5 %CO₂ para a aderência dos macrófagos. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com PBS estéril para a retirada das células não aderidas e foram adicionados neutrófilos senescentes (1×10^6 neutrófilos/poço). Os neutrófilos senescentes foram obtidos previamente da cavidade peritoneal de animais Balb/C selvagens, após administração de glicogênio de ostra (0,1%, i.p., Sigma Aldrich) e incubados em placa de 24 poços, com meio RPMI (1×10^6 neutrófilos/mL), por 18 h a 37°C com 5 %CO₂, para atingirem o estado de senescência. As lamínulas foram lavadas 1 vez com PBS para retirada do excesso de neutrófilos senescentes e coradas pelo método de May Grumwald-Giemsa (Sigma Aldrich) modificado (ROSENFELD, 1947). Posteriormente, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com Bálsamo do Canadá (Synth, Diadema, SP, BR) para análise em microscópio de luz (objetiva de 100X). Foram observados 500 macrófagos e o resultado da fagocitose de neutrófilos senescentes foi expresso em porcentagem.

3.14 Inflamação no tecido subcutâneo dorsal – Bolsa de ar

Um compartimento estéril, denominado bolsa de ar, foi desenvolvido pela administração de 3 mL de ar estéril no tecido subcutâneo da região dorsal de camundongos Balb/C selvagens tratados com ACTH, conforme o item 3.2.2, os quais foram anestesiados previamente a este procedimento. Cinco dias após a primeira injeção de ar, um reforço foi realizado pela injeção de 3 mL de ar estéril, segundo procedimento descrito por Sedgwick 1986 e por Jain & Parmar 2011.

Dez dias após a primeira injeção, os animais foram anestesiados e LPS (100 µg/mL, lipopolissacarídeo de *E. coli*, ATC 026B6 Sigma Aldrich), em volume final de 2 mL de solução tamponada de fosfato (PBS), foram injetados diretamente na bolsa. Quatro horas mais tarde, uma pequena incisão foi realizada na bolsa de ar para obtenção do lavado do infiltrado inflamatório, no qual foram determinados o número de leucócitos. O número total e diferencial de leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer e o diferencial em esfregaços corados por Panótico (Laborclean) para microscopia de luz.

3.15 Microscopia intravital

A microscopia intravital é uma técnica utilizada para o estudo da dinâmica dos eventos da microcirculação em animais vivos, pela observação direta da rede microvascular de tecidos transiluminados ou não em monitores de TV e/ou de computador. As imagens da microcirculação do músculo cremaster foram obtidas em microscopia de luz (Carl-Zeiss, Axioplan II; objetivas 10 ou 40 vezes) e capturadas por câmera de projeção de imagem (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss), ligada ao microscópio, para monitores de TV ou de computador.

Os aumentos proporcionados pelas objetivas do microscópio, pela optovar (sistema adicional de ampliação de imagem localizado no microscópio) e pela câmera de projeção de imagem conferem ampliação e nitidez suficiente para as análises quali e quantitativas da interação leucócito-endotélio nas telas dos monitores de computador. O computador possui um programa de análise de imagem (Axio vision 4, Carl-Zeiss) que permite análises quantitativas das imagens digitalizadas.

Os camundongos foram anestesiados e submetidos à manipulação cirúrgica para exposição da microcirculação do músculo cremaster para observação da rede microcirculatória conforme descrito acima. A observação da microcirculação do cremaster foi realizada em microscopia de transiluminação em animais tratados ou não com ACTH (5 µg/animal). Para cada animal foram visualizados 5 diferentes campos da microcirculação, sendo avaliado o número de leucócitos em processo de rolling durante 10 minutos e os leucócitos aderentes foram quantificados após este período. Os leucócitos *rollers* foram expressos pelo número de leucócitos que deslizavam sobre a parede do vaso em uma extensão de 200 µm por 10 minutos e o

número de aderidos, pelo número de leucócitos que permaneciam aderidos a 100 μm de vaso após 10 min.

3.16 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), quando necessário, foi utilizado como pós-teste o Teste de Tukey-Kramer (SOKAL & ROHLF, 1995), e teste *t-student*. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism[®], admitindo como significativamente estatístico o $p < 0,05$.

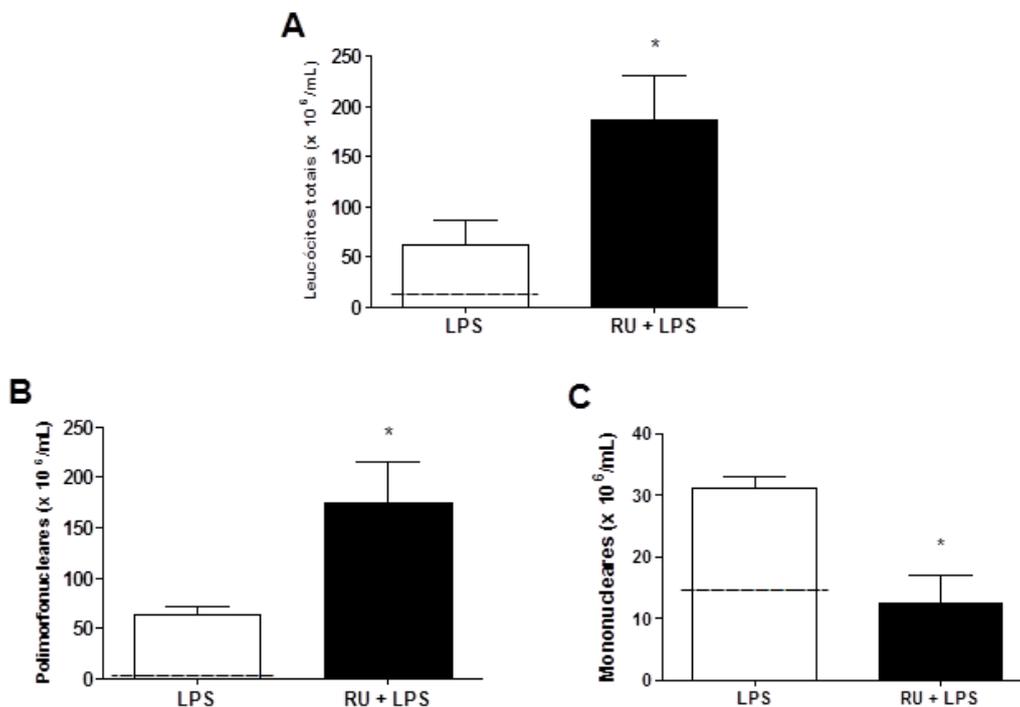
4 RESULTADOS

4.1 SEÇÃO 1: *Otimização das condições experimentais propostas*

4.1.1 *Otimização do tratamento farmacológico in vivo com RU 38486*

O RU 38486 é um antagonista do GR e sua eficácia *in vivo* pode ser quantificada pela análise do influxo de células para um compartimento (FARSKY et al., 1995; MIZOBE et al., 1997; LEECH et al., 1998; LAZZARINI et al., 2010). Como o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos GCe sobre o tráfego de neutrófilos, a eficácia do tratamento *in vivo* com RU 38486 foi avaliada pela quantificação da migração de neutrófilos para o peritônio, no modelo de peritonite induzida pelo LPS. Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que o número total de leucócitos é maior no exsudato obtidos de animais tratados com RU 38486 do que o observado em animais controles, tratados com o veículo ($p < 0,05$). A análise diferencial destas células mostrou que o aumento de leucócitos refletia número maior de células polimorfonucleares (Figura 6B) quando comparados com os animais tratados apenas com veículo do RU 38486. O número menor de células mononucleares é decorrente de um artefato técnico, já que a porcentagem destas foi menor, em decorrência do aumento marcado de polimorfonucleares.

Figura 6. Efeito do tratamento *in vivo* com o RU 38486 na inflamação aguda induzida por LPS.



(A) Número total de leucócitos ($\times 10^6$ mL), (B) polimorfonucleares ($\times 10^6$ mL) e (C) mononucleares ($\times 10^6$ mL) no lavado peritoneal de animais tratados com RU 38486 ou veículo 4 horas após a indução de processo inflamatório induzido por LPS. Os dados representam os valores de média \pm e.p.m. de 3 animais. * $p < 0,05$ vs LPS; ---- indica o valor basal.

4.1.2 Otimização do tratamento farmacológico *in vivo* com ACTH

O tratamento *in vivo* com ACTH acarretou aumento significativo na concentração de corticosterona circulante, o principal GCe em murinos, tanto em animais tratados com veículo, com RU 38486 e em animais nocautes para ANXA1. A concentração de corticosterona circulante nos animais ANXA1^{-/-} que receberam veículo foi menor do que os valores encontrados nos animais selvagens. Da mesma forma, a administração de ACTH não elevou os níveis deste hormônio na circulação de maneira equivalente em animais ANXA1^{-/-} ou selvagens (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de corticosterona (ng/mL) no plasma sanguíneo.

| Grupos | Tratamentos | |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Veículo | ACTH |
| WT Veículo do RU | 72,2 ± 3,66 | 270,6 ± 20,5** |
| WT RU 38486 | 65,9 ± 9,6 | 171,9 ± 23,9** |
| Selvagens (WT) | 70,2 ± 5,66 | 260,6 ± 19,5** |
| ANXA1 ^{-/-} | 34,8 ± 5,66 [#] | 68,9 ± 10,0* [§] |

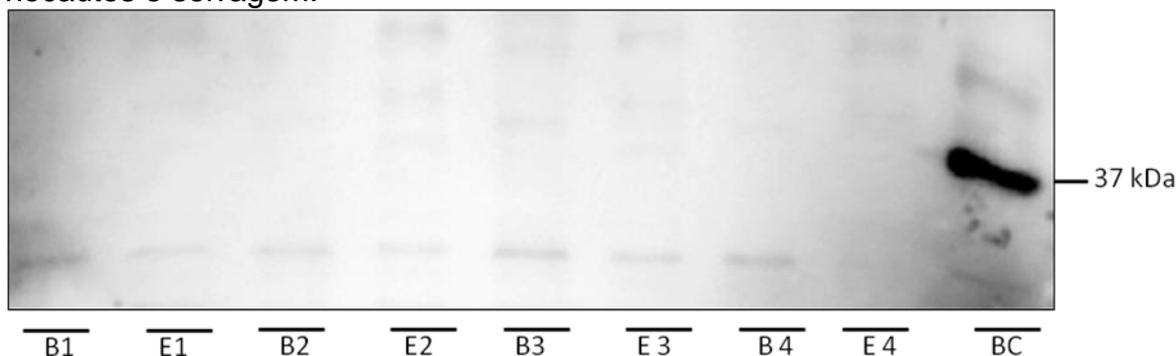
Animais selvagens tratados o veículo ou com RU 38486 (10mg/kg, i.p; 24 ou 2 horas antes da injeção de ACTH) e animais ANXA1^{-/-} receberam ACTH (5 µg/animal, i.p.). Após 4 horas, o sangue periférico foi coletado da aorta abdominal (n= 6/grupo); *p<0,05; **p<0,01 vs respectivo veículo; #p<0,05 vs animais selvagens; §p<0,05 vs animais selvagens tratados com ACTH.

4.1.3 Otimização da deleção gênica nos animais nocautes para a proteína ANXA1

Com intuito de confirmar a deleção do gene nos animais nocautes para ANXA1, foi realizado o ensaio de expressão protéica por Western blotting. A verificação da ausência da expressão da proteína ANXA1 é essencial para validação dos experimentos posteriores que exigem o emprego dos animais nocautes. Foram empregados 25 µg de proteína do homogenato de baço e estômago de animais nocautes selecionados randomicamente das cruzas das matrizes. Como grupo controle foi utilizado camundongo Balb/C selvagem.

A ausência da banda com peso molecular de 37 kDa (Figura 7) demonstra que os animais nocautes não expressam a proteína ANXA1 nos tecidos pesquisados. O camundongo Balb/c selvagem possui uma alta expressão da proteína ANXA1 no tecido analisado com a presença da banda em 37 kDa. Ainda, após a padronização deste ensaio, o controle da expressão proteica em animais nocautes foi realizado semestralmente para controle da constância da deleção gênica, garantindo assim a reprodutibilidade e confiabilidade dos experimentos.

Figura 7. Expressão de anexina-A1 no baço e estômago de camundongos Balb/C nocautes e selvagem.



Homogenatos de tecidos foram obtidos do baço (B1, B2, B3 e B4) e estômago (E1, E2, E3 e E4) de camundongos nocautes para ANXA1 e baço de camundongo Balb/C selvagem (BC). O ensaio de Western blotting utilizando-se anticorpo monoclonal de coelho anti-anexina-A1 para detectar a expressão desta proteína (banda de 37 kDa).

4.1.4 Discussão

Até o momento, está bem descrito que os efeitos anti-inflamatórios dos GCe e sintéticos são mediados pela interação do hormônio com o receptor citosólico, apesar de haver descrições de interações hormonais com as membranas celulares, quer seja por interações físicas ou por receptores recém descritos, ou mesmo por ações intracelulares não dependentes de transcrição gênica (ALMAWI & MELEMEDJIAN, 2002). Dentre os efeitos mediados pelos GCe, tem sido descrito que o bloqueio do receptor com o antagonista RU 38486 aumenta a interação leucócito-endotélio e a migração leucocitária (PEERS et al., 1988; FARSKY et al., 1995; LIM et al., 2000; PITZALIS et al., 2002).

Diversos trabalhos na literatura que tiveram como objetivo verificar o papel dos GCs na migração leucocitária ou investigar mecanismos dependentes de GC utilizaram diferentes modelos de tratamentos envolvendo o bloqueador de GR RU 38486 (PEERS, et al., 1993; LIANG-SUO, 2002; CAVALCANTI et al., 2007; SMITH et al., 2010). Nestes trabalhos, este fármaco foi administrado em diferentes concentrações e tempos de exposições. Baseado nestas informações, primeiramente foi realizado o experimento para validar a eficácia do tratamento *in vivo* com o RU 38486, utilizando a dose (10mg/kg) e tempo estabelecidos (24h e 2h antes dos experimentos).

Os trabalhos de Farsky et al. (1995) e Tjandra et al. (1996) mostraram que na ausência da ação dos GCe pelo tratamento com RU 38486, na vigência ou ausência de um processo inflamatório, ocorre regulação dos GCe sobre a interação leucócito-endotélio. Nos animais tratados com RU 38486 ocorrem aumentos nos números de leucócitos *rolling*, aderentes e, conseqüentemente, migrados para o tecido inflamado (LAUE et al., 1988; FARSKY et al., 1995; TJANDRA et al., 1996; LIGEIRO DE OLIVEIRA, 2004). Com base neste contexto, o protocolo de tratamento empregado neste trabalho foi eficaz quanto à validação do mecanismo de ação do RU 38486, uma vez que o recrutamento de neutrófilos para o peritônio inflamado pelo LPS foi maior em animais tratados com RU 38486 do que nos controles.

A literatura mostra, com bastante evidência, que a administração de GCs ou a elevação dos níveis destes hormônios em condições fisiopatológica causa neutrofilia. Uma vez que nossos dados mostraram que a ausência de GCe ou bloqueio do seu receptor citosólico causa aumento do número de neutrófilos na circulação (FARSKY et al., 1995; CAVALCANTI et al., 2006; 2007), este projeto também teve por objetivo verificar as bases moleculares deste processo em altas concentrações de GCe. Assim, a estratégia experimental escolhida foi administração do ACTH, que apesar de bem descrita pela literatura, os mecanismos moleculares que regem este efeito ainda não são completamente conhecidos (HARRIS et al., 1995; LILES et al., 1997; NAKAGAWA et al., 1998; ANDERSON et al., 1999; WEBER et al., 2001, 2004). A administração de ACTH elevou os níveis de GCe no sangue circulante nos animais tratados previamente com veículo, com RU 38486 e em animais selvagens. Diferentemente, os animais ANXA1^{-/-} apresentaram níveis menores de corticosterona em relação aos selvagens em condições basais, e esta diferença permaneceu na vigência do tratamento com ACTH. Estes dados são inéditos em animais nocautes para ANXA1 com *background* Balb/C, entretanto no estudo de Morris et al. (2006) em camundongo nocautes para ANXA1 da linhagem C57/BL6, foi demonstrado aumento nos níveis de ACTH na glândula pituitária de machos, porém sem alterações nos níveis de ACTH plasmático e corticosterona em condições fisiológicas. Contrariamente, em um estudo *in vitro*, Davies et al. (2007) mostraram que células adrenais, não estimuladas, secretam quantidades de corticosterona semelhantes, porém quando estimuladas com ACTH, essas células obtidas de animais ANXA1^{-/-} apresentam aumento na secreção desse hormônio.

Dados na literatura mostraram que adrenalectomia e a administração de GCs levam a diminuição e aumento, respectivamente, da síntese de ANXA1 em macrófagos peritoneais de ratos (BLACKWELL & CRAWFORD, 1992). De fato, a expressão de ANXA1 em leucócitos do sangue periférico de pacientes com Síndrome de Cushing foi aumentada e correlacionada com o elevado nível de cortisol, enquanto que pacientes com Síndrome de Addison apresentaram redução na expressão de ANXA1 e baixos níveis de cortisol antes e após a injeção de ACTH, em comparação com os pacientes com a função adrenal normal (JOHN et al., 2004; MULLA et al., 2005; TATENO et al., 2007), confirmando a participação dos GCs na secreção de ANXA1 (BUCKINGHAM, 1996; PERRETTI & GAVINS, 2003; PERRETTI & FLOWER, 2004; VANDEVYVER et al., 2013).

Ainda, estudos adicionais confirmaram a participação dos GCs na expressão de ANXA1 através da quantificação de expressão gênica e proteica desta proteína em uma variedade de células e tecidos *in vitro* e *in vivo* (FULLER & VERITY, 1989; VISHWANATH et al., 1992), incluindo o hipotálamo e a glândula pituitária (BUCKINGHAM et al., 2003). De fato, tem sido identificado um papel importante da ANXA1 na mediação das ações dos GCs, pois foi mostrado que os efeitos inibitórios dos GCs sobre a secreção de ACTH e corticosterona *in vivo* induzida por estresse são da mesma forma reproduzidos pela injeção intracerebroventricular de ANXA1 recombinante humana ou peptídeos derivados da porção N-terminal (TAYLOR et al., 1993; TAYLOR et al., 1995; BUCKINGHAM et al., 2006). Em conjunto, a ANXA1 parece desempenhar um papel particularmente importante na modulação das respostas do eixo HPA frente a estímulos inflamatórios e em condições de homeostasia (LOXLEY et al., 1993; JOHN et al., 2008).

Além da otimização do protocolo experimental com RU 38486 e ACTH, fez-se necessária a confirmação da manipulação gênica para geração de animais Balb/C nocautes para proteína ANXA1, realizada por Hannon et al. (2003). Animais geneticamente deficientes para ANXA1 tem sido uma estratégia importante para verificar o papel desta molécula na regulação dos efeitos anti-inflamatórios dos GC (para revisão ver PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009). Baseado nestes trabalhos, a metodologia de Western blotting foi utilizada para verificar a expressão da ANXA1 pelos animais nocautes e selvagens. O resultado obtido neste ensaio viabilizou os experimentos que utilizaram estes animais, pois não foi detectado o aparecimento

de bandas com peso molecular de 37 kDa nos tecidos (baço e estômago) de animais nocautes em relação ao camundongo selvagem.

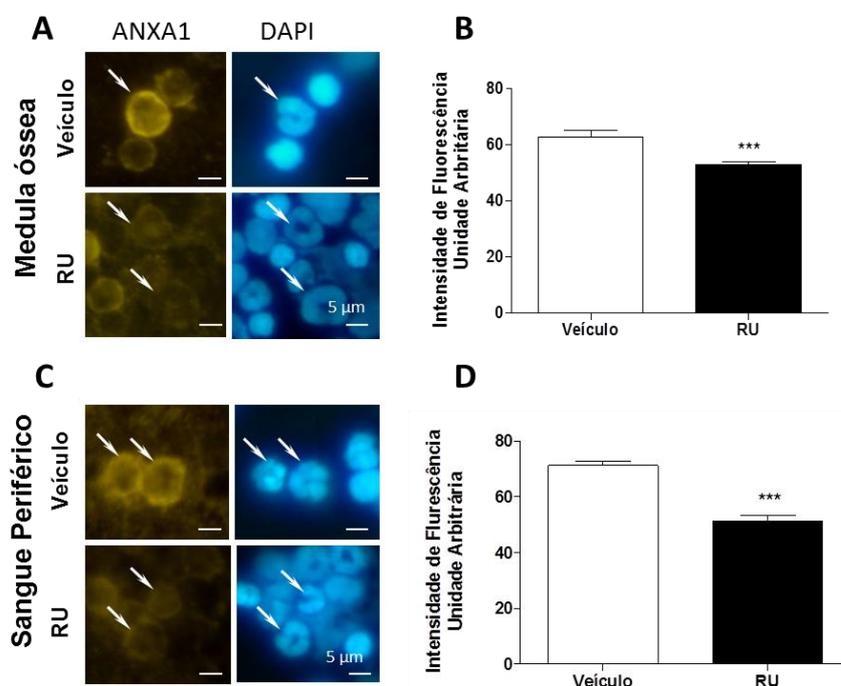
Os dados aqui obtidos mostram que as condições experimentais foram otimizadas, trazendo assim maior credibilidade e reprodutibilidade para realização dos experimentos. Ainda, mostram que a ANXA1 exerce papel importante na secreção dos GCE, embora os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não estejam estabelecidos.

4.2 SEÇÃO 2: ANXA1 modula o tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue através da regulação do eixo SDF-1 α /CXCR4/CXCR2

4.2.1 ANXA1 e o receptor FPR2 são expressos em neutrófilos da medula óssea e do sangue periférico e modulam a maturação neutrofílica

Para avaliar a expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea e a modulação dos GCe sobre esta expressão, foram realizados ensaios de imunofluorescência em granulócitos da medula óssea e neutrófilos do sangue periférico. Os dados obtidos mostram que granulócitos da medula óssea expressam ANXA1 no citosol e na membrana, constitutivamente, e que a expressão é regulada pelo receptor citosólico de GC, uma vez que a expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea e sangue periférico de animais tratados com RU 38486 foi menor que a observada em animais controles (Figura 8).

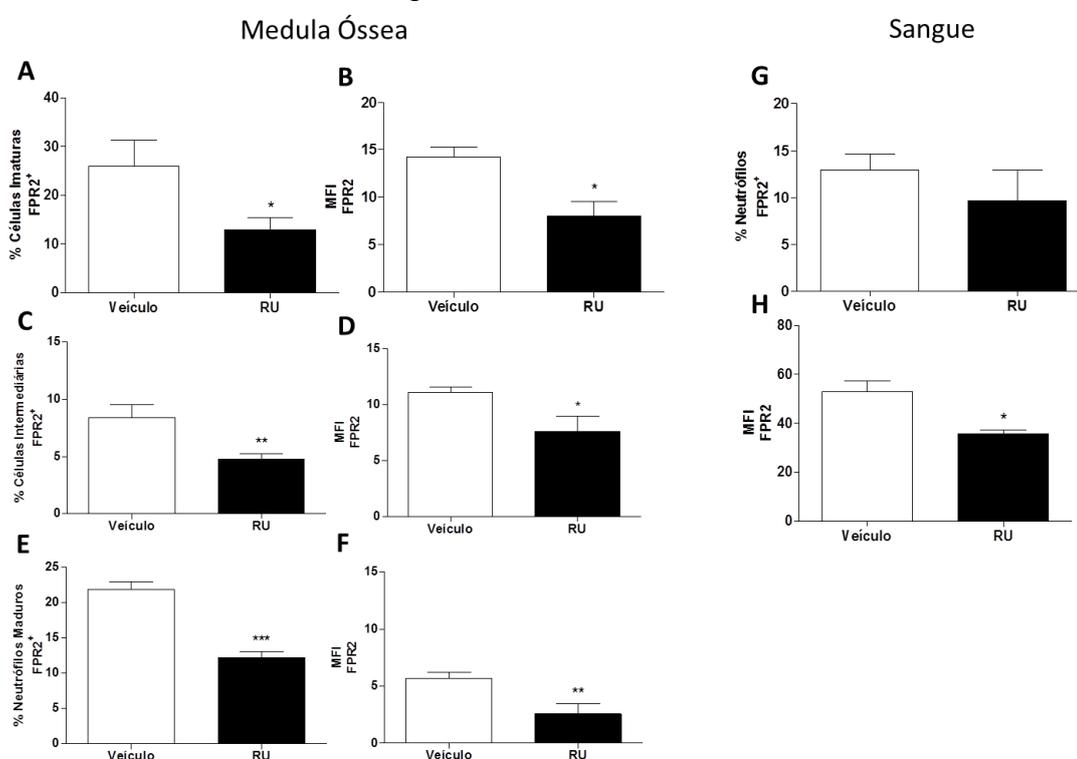
Figura 8. Expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea e sangue periférico de animais tratados com veículo ou RU 38486.



Camundongos Balb/C foram tratados com veículo ou RU 38486 (10 mg/kg, i.p, 24 e 2h antes do experimento). A expressão de ANXA1 foi realizada por imunofluorescência e quantificada por microscopia de luz. (A e C) Figuras representativas da expressão de ANXA1 e DAPI em neutrófilos (setas) na medula óssea e sangue periférico, respectivamente. Análise densitométrica da expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea (B) e sangue periférico. Os resultados expressam média \pm epm de células obtidas de 06 animais em cada grupo. ***P<0,001 vs controle.

Para avaliar a expressão do receptor FPR2 nos diferentes estágios de maturação granulocítica na medula óssea e em neutrófilos do sangue periférico de animais tratados com RU 38486 foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Os dados obtidos neste ensaio mostram que o RU 38486 modula o número de células FPR2⁺ e a expressão deste receptor por célula nos diferentes estágios de maturação, bem como modula a expressão do receptor FPR2 nos neutrófilos do sangue periférico (Figura 9).

Figura 9. Expressão de FPR2 em neutrófilos do sangue periférico e em granulócitos da medula óssea de camundongos tratados com RU 38486.

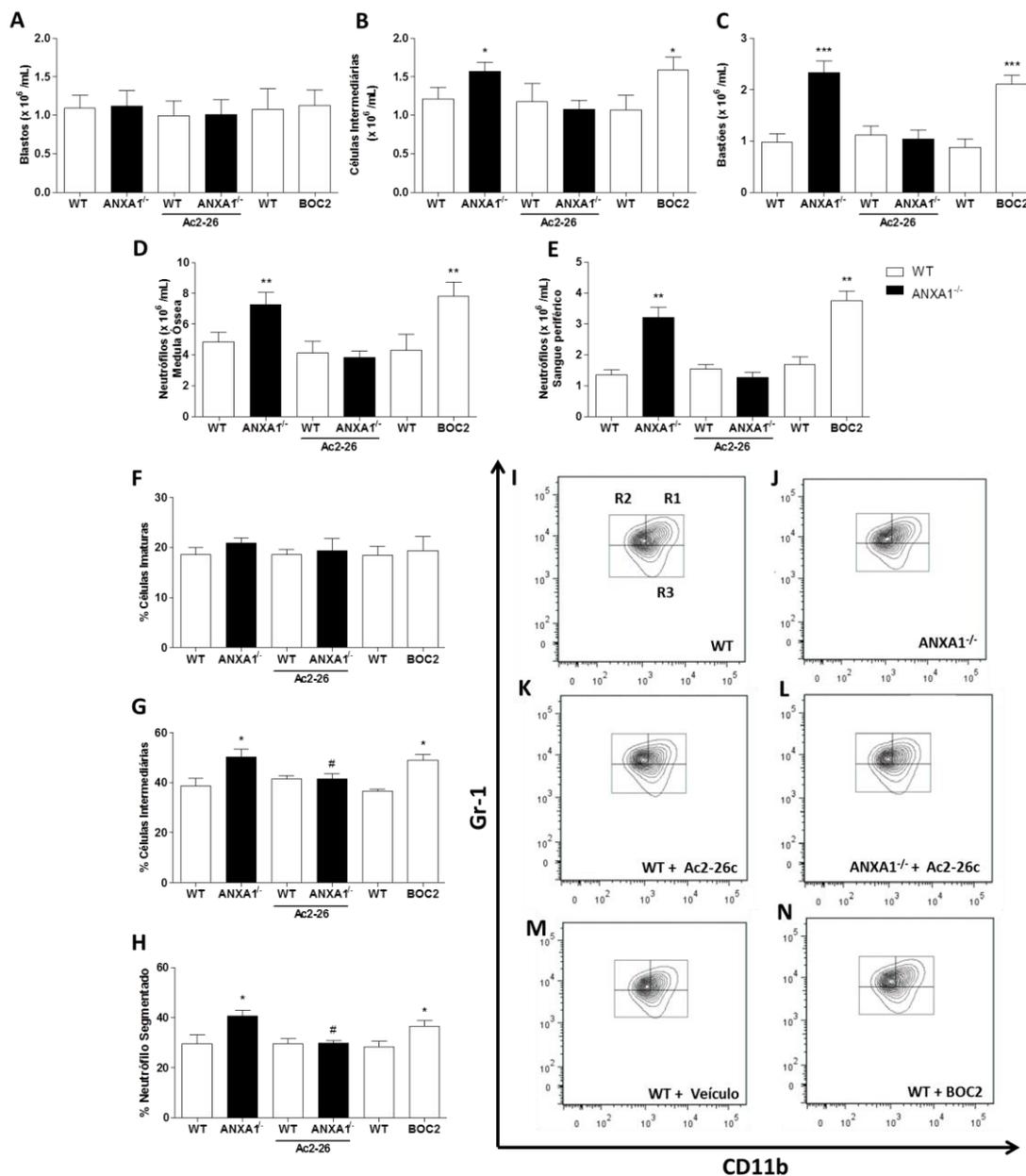


Camundongos Balb/C tratados com RU 38486 (RU;10mg/kg, i.p.) ou veículo 24 e 2 horas antes do experimento. Os animais foram anestesiados e o sangue periférico foi coletado da aorta abdominal e o canal medular perfundido. (A, C, E e G) % de células positivas para FPR2 e (B, D, F e H) expressão de FPR2 por célula. (A) Células imaturas (promielócito e mielócito), (C) células intermediárias (metamielócito e bastão) e (E) neutrófilos maduros (neutrófilos segmentados). Os dados representam os valores de média \pm e.p.m. de 6 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle.

A expressão de ANXA1 em neutrófilos afeta o processo de maturação, pois o número de células intermediárias, bastões e neutrófilos maduros na medula óssea (Figura 10B-D), assim como os neutrófilos no sangue periférico estavam aumentados em animais ANXA1^{-/-} (Figura 10E), sugerindo que a deficiência de

ANXA1 causa aceleração no processo de maturação neutrofílica. No entanto, a deficiência de ANXA1 não modificou o número de blastos.

Figura 10. Efeitos dos tratamentos com BOC2 ou Ac2-26 sobre a maturação de granulócitos na medula óssea.



Camundongos Balb/C selvagens (WT) foram tratados com BOC2 (10 μ g/animal, i.p.) ou veículo durante 4 dias, 1 vez ao dia. Animais Balb/C selvagens e ANXA1^{-/-} foram tratados com o peptídeo Ac2-26 (1 mg/kg, i.p.) ou veículo durante 4 dias, 1 vez ao dia. Os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM. (A) células imaturas (R3, promielócito e mielócito), (B) células intermediárias (R2, metamielócito e bastão) e (C) neutrófilos maduros (R1, neutrófilos segmentados). (D) Figura representativa da marcação por citometria de fluxo com os anticorpos Ly6G (Gr-1) e CD11b. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. de 6 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação aos valores obtidos no grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle.

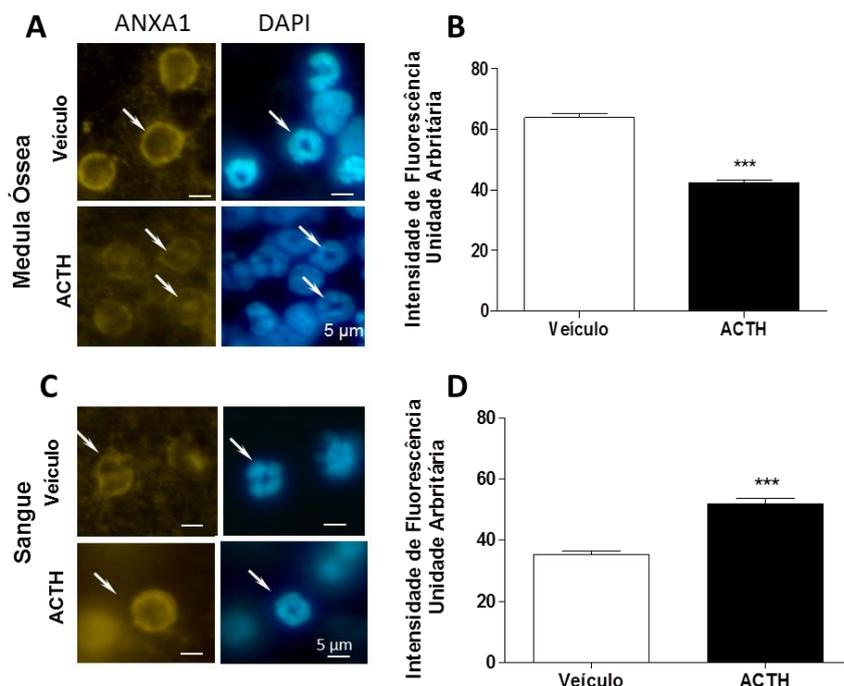
Corroborando o papel da ANXA1 e do FPR2 na granulopoiese, a administração do peptídeo bioativo da ANXA1, Ac2-26, em animais ANXA1^{-/-} reverteu todas as alterações observadas na granulopoiese (Figura 10B, C, D, F e G). Por outro lado, o tratamento de animais selvagens com o antagonista de receptores FPRs, o BOC2, induziu modificações na granulopoiese similares a observadas em animais ANXA1^{-/-} (Figura 10B-E).

4.2.2 ANXA1 modula a mobilização de neutrófilos maduros da medula óssea para o sangue

Para confirmar o papel da ANXA1 como um mediador na mobilização de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico, animais selvagens e ANXA1^{-/-} foram tratados com ACTH e, após 4 horas, neutrófilos do sangue periférico foram quantificados. O ACTH induziu a mobilização do *pool* de neutrófilos maduros da medula óssea para o sangue, os quais eram ANXA1⁺; no entanto, a expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea foi menor em relação ao grupo veículo (Figura 11).

É interessante salientar que os animais tratados com RU 38486 (Figura 8) ou animais tratados com ACTH (Figura 11) apresentaram neutrofilia (dados não mostrados), confirmando a ação do GR na produção de ANXA1 e que esta diferença possa ser devido à mobilização de populações diferentes de células.

Figura 11. Efeito do ACTH na expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea e sangue periférico.



Camundongos Balb/C selvagens foram tratados com ACTH (5 µg/animal, i.p., 4 horas antes do experimento) ou veículo. A expressão de ANXA1 foi realizada por imunofluorescência e quantificada por densitometria (B e D). (A e C) Figuras representativas da expressão de ANXA1 e DAPI (setas) em neutrófilos da medula óssea e sangue periférico, respectivamente. Os resultados expressam média ± e.p.m. de células obtidas de 06 animais em cada grupo. ***P<0,001 vs controle.

4.2.3 ANXA1 altera o perfil de células CXCR4⁺ na medula óssea e no sangue periférico

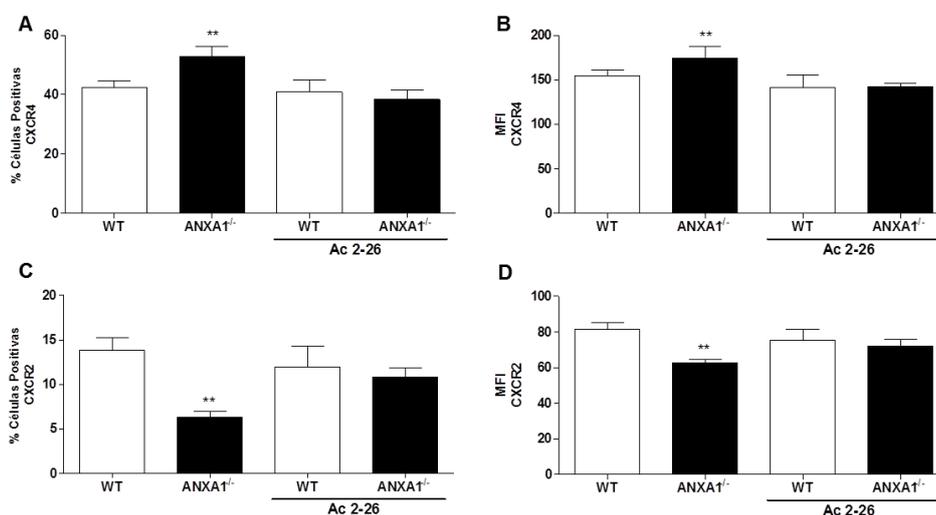
Em um trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo (DALLI et al., 2012a) foi mostrado que os animais ANXA1^{-/-} apresentam neutrofilia e os dados aqui obtidos confirmaram este dado, porém os mecanismos envolvidos não estão completamente esclarecidos. Como já salientado, a expressão do receptor CXCR4 em neutrófilos da medula óssea e do sangue periférico indica o perfil de *homing* e *clearance* de neutrófilos senescentes na medula óssea, e o aumento da expressão CXCR4 em ambos os compartimentos indica a presença de células senescentes. Ainda, este padrão de células pode ser confirmado com a presença da baixa expressão de CXCR2 (FURZE & RANKIN, 2008a; 2008b).

Os animais ANXA1^{-/-} apresentaram aumento no número de neutrófilos CXCR4⁺ circulantes, bem como a expressão deste receptor por célula (Figura 12A e B). No entanto, o número de neutrófilos circulantes CXCR2⁺ e a expressão por

célula deste receptor estavam reduzidos em animais deficientes de ANXA1 (Figura 12C e D). Este perfil de expressão dos receptores CXCR4 e CXCR2 apresentados pelos animais ANXA1^{-/-} foi revertido pela administração do peptídeo Ac2-26 nestes animais (Figura 12A-D).

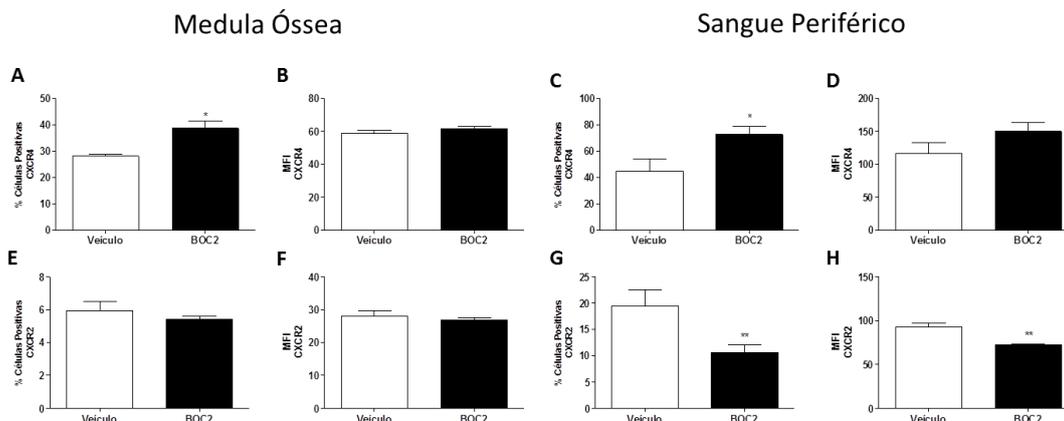
Ainda, o tratamento de animais WT com BOC2 aumentou e reduziu a expressão de neutrófilos CXCR4⁺ e CXCR2⁺ no sangue periférico, respectivamente (Figura 13C, D, G e H). Já na medula óssea, o tratamento BOC2 aumentou o número de neutrófilos CXCR4⁺ (Figura 13A), perfil semelhante foi observado previamente em animais ANXA1^{-/-} (DALLI et al., 2012a).

Figura 12. Efeitos dos tratamentos *in vivo* com Ac2-26 sobre a expressão de CXCR4 e CXCR2 em neutrófilos do sangue periférico.



Animais Balb/C selvagens (WT) e ANXA1^{-/-} foram tratados com o peptídeo Ac2-26 (1 mg/kg, i.p.) ou veículo durante 4 dias, 1 vez ao dia. Os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM e o sangue obtido da aorta abdominal. As expressões dos receptores foram quantificadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 6 animais em cada grupo. **p<0,01 em relação aos valores obtidos no grupo veículo.

Figura 13. Efeitos do tratamento *in vivo* com BOC2 sobre a expressão de CXCR4 e CXCR2 em granulócitos da medula óssea e neutrófilos do sangue periférico.

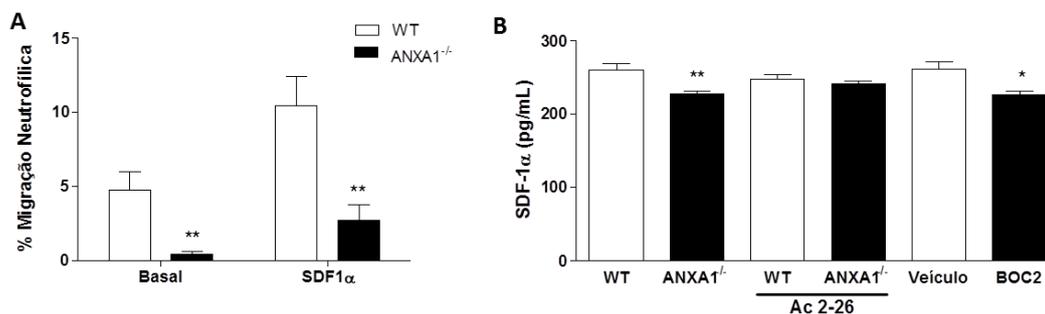


Camundongos Balb/C selvagens foram tratados com BOC2 (10 µg/animal, i.p.) ou veículo durante 4 dias, 1 vez ao dia. Os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM e o sangue obtido da aorta abdominal. As expressões dos receptores foram quantificadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 6 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação aos valores obtidos no grupo veículo.

4.2.4 ANXA1 controla a secreção e quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo SDF-1 α

O número elevado de neutrófilos CXCR4⁺ no sangue periférico em animais ANXA1^{-/-} poderia sugerir migração reduzida destas células em resposta ao SDF-1 α da medula óssea. Esta hipótese foi testada pelo ensaio de quimiotaxia *in vitro* e os resultados obtidos corroboraram esta hipótese, uma vez que neutrófilos obtidos de animais ANXA1^{-/-} apresentaram menor resposta quimiotática em resposta ao SDF-1 α (Fig. 14A). É importante ressaltar que os níveis de SDF-1 α na medula óssea estavam reduzidos nos animais deficientes de ANXA1 (14B), o que foi revertido após 4 dias de tratamento com o peptídeo Ac2-26. Por outro lado, o tratamento com BOC2 também induziu diminuição nos níveis de SDF-1 α secretado pelas células do estroma medular (Fig. 14B).

Figura 14. Efeitos *in vitro* dos tratamentos *in vivo* com Ac2-26 ou BOC-2 sobre a quimiotaxia e secreção de SDF-1 α .



Camundongos Balb/C selvagens (WT) foram tratados com BOC2 (10 μ g/animal, i.p.) ou veículo durante 4 dias, 1 vez ao dia. Animais Balb/C selvagens e ANXA1^{-/-} foram tratados com o peptídeo Ac2-26 (1 mg/kg, i.p.) ou veículo durante 4 dias, 1 vez ao dia. Os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM e a quantificação de SDF-1 α foi realizada no perfusato medular por ELISA. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. de 6 animais em cada grupo. * p <0,05 e ** p <0,01 em relação aos valores obtidos no grupo veículo.

4.2.5 Discussão

Os resultados obtidos nesta etapa do estudo mostraram que neutrófilos da medula óssea expressam ANXA1 no citoplasma e na membrana o receptor FPR2 constitutivamente, e que a expressão de ambos é regulada pelo receptor citosólico de GC, uma vez que suas expressões foram menores em células dos animais tratados com RU 38486. Estes dados estão sendo apresentados pela primeira vez na literatura e sugerem que a ANXA1 seja relevante para o controle da granulopoiese e tráfego de neutrófilos exercidos pelos GCs. Desta forma, a continuidade do trabalho foi investigar esta hipótese.

Os resultados obtidos mostram que os animais ANXA1^{-/-} e selvagens, tratados com o antagonista de receptor FPR, BOC2, apresentaram valores de células imaturas equivalentes aos obtidos em animais selvagens. Este dado corrobora o trabalho do nosso grupo recentemente publicado, onde mostra valores de G-CFU e proliferação granulocítica após o tratamento com G-CSF semelhantes em animais ANXA1^{-/-} e selvagem (DALLI et al., 2012a). No entanto, mostramos que a ANXA1, via o receptor FPR, modula a maturação subsequente dos neutrófilos, já que na medula de animais deficientes em ANXA1 e animais selvagens tratados com BOC2 observou-se elevação do número de células intermediárias, metamielócitos e bastões, e do número de neutrófilos segmentados na última etapa de maturação. Ainda, animais ANXA1^{-/-} tratados com o peptídeo Ac2-26 apresentaram reversão no

aumento de células intermediárias e na redução de células maduras observadas nos animais nocautes. Estes dados foram inicialmente obtidos por análise morfológica e, posteriormente, confirmados por citometria de fluxo, segundo descrito por Angulo et al. (2000) e Trottier et al. (2008). Este ensaio permite a discriminação de três populações distintas, células imaturas (promielócito e mielócito), células intermediárias (metamielócito e bastão) e neutrófilos maduros (neutrófilos segmentados) pela marcação de receptores de membrana.

Assim, em conjunto, os resultados obtidos até então mostraram que a ANXA1 e o FPR2 expressos em células da medula óssea controlam a maturação neutrofílica e o tráfego destas células entre os compartimentos medula-sangue. A real ação da ANXA1 no processo de maturação neutrofílica não está estabelecida, mas é possível supor que a proteína controla o ciclo celular. Vale ressaltar que resultados bastante similares do nosso grupo foram obtidos pelo com animais adrenalectomizados e tratados com RU 38486 (CAVALCANTI et al., 2007), sugerindo que a ANXA1 seja a mediadora dos GCs nestes processos.

Como já salientado, doses farmacológicas de ACTH são indutoras da mobilização de neutrófilos e este efeito parece ser dependente da secreção de GCs (ROTH et al., 1982; SALAK-JOHNSON et al., 1996; ABRAHAM et al., 2009). Assim, este protocolo experimental foi empregado para caracterizar a população de neutrófilos mobilizados para o sangue. No entanto, o tratamento com ACTH também reduziu a expressão de ANXA1 em neutrófilos na medula óssea e aumentou a expressão de ANXA1⁺ em neutrófilos circulantes, mostrando que as células aptas a migrarem são ANXA1⁺.

Em dados prévios publicados pelo nosso grupo foi mostrado que o número elevado de neutrófilos na medula óssea de animais ANXA1^{-/-} reflete o acúmulo de células senescentes CXCR4⁺, causado pela diminuição de fagocitose pelos macrófagos da medula óssea (DALLI et al., 2012a). Os animais ANXA1^{-/-} também apresentam neutrofilia, o que parece não ser dependente do aumento da mobilização para o sangue em resposta a fatores quimiotáticos fisiológicos, como o CXCL-1 (DALLI et al., 2012a). Desta forma, foi lançada a hipótese que a neutrofilia poderia ser dependente de alterações no eixo SDF-1 α /CXCR4. De fato, a expressão de CXCR4 por célula, bem como o número de neutrófilos CXCR4⁺ estavam aumentados no sangue periférico de animais ANXA1^{-/-}. Ainda, a expressão de CXCR2 estava reduzida na membrana de neutrófilos, o que mostra que a ANXA1

aumenta o tempo de meia vida destas células no sangue. O papel da ANXA1 no controle da expressão de CXCR4/CXCR2 foi ainda confirmado pelas seguintes observações: 1) na vigência do bloqueio de receptores FPRs em animais selvagens, o perfil de expressão de CXCR4 e CXCR2 em células da medula óssea e do sangue foi similar aos resultados obtidos em animais ANXA1^{-/-} e 2) o tratamento de animais ANXA1^{-/-} com o peptídeo Ac-2-26 reverteu o perfil alterado de expressão dos receptores. Estes resultados, em conjunto, sugerem que o controle exercido pela ANXA1 no eixo CXCR4/CXCR2 é dependente da interação da ANXA1 ao seu receptor de membrana FPR2.

A maior expressão de CXCR4 na membrana de neutrófilos de animais ANXA1^{-/-} pode ser controversa para a hipótese de uma maior meia vida no sangue, pois elas poderiam ser mais responsivas ao SDF-1 α produzido na medula óssea. Em contraste, o ensaio de quimiotaxia *in vitro* mostrou migração reduzida de neutrófilos do sangue de ANXA1^{-/-} em resposta ao SDF-1 α , sugerindo que a ANXA1 também modula as funções do receptor CXCR4. O CXCR4 é um receptor de sete domínios transmembranas, acoplados a proteína G (GPCR; MÖHLE & DROST, 2012; RATAJCZAK et al., 2012), e as ações da ANXA1 sobre receptores desta natureza tem sido descritas, uma vez que a ANXA1 bloqueia a migração de neutrófilos induzidas pelo fMLP, que liga-se ao FPR1, também um GPCR (DALLI et al., 2012b; GAVINS et al., 2012; QIN et al., 2013). No entanto, as ações da ANXA1 sobre o CXCR4 está sendo descrita pela primeira vez, requer investigações futuras.

Ainda, verificamos que a ANXA1 exerce um controle adicional sobre o eixo SDF-1 α /CXCR4, pois os níveis do agente quimiotáxico no perfusato de animais ANXA1^{-/-} foram inferiores aos encontrados nos animais selvagens. A expressão e ações da ANXA1 produzidas por células do estroma da medula óssea ainda não reportadas e, da mesma forma que o controle da ANXA1 sobre a função de CXCR4, necessita de investigações mais aprofundadas para esclarecer o mecanismo de ação da ANXA1.

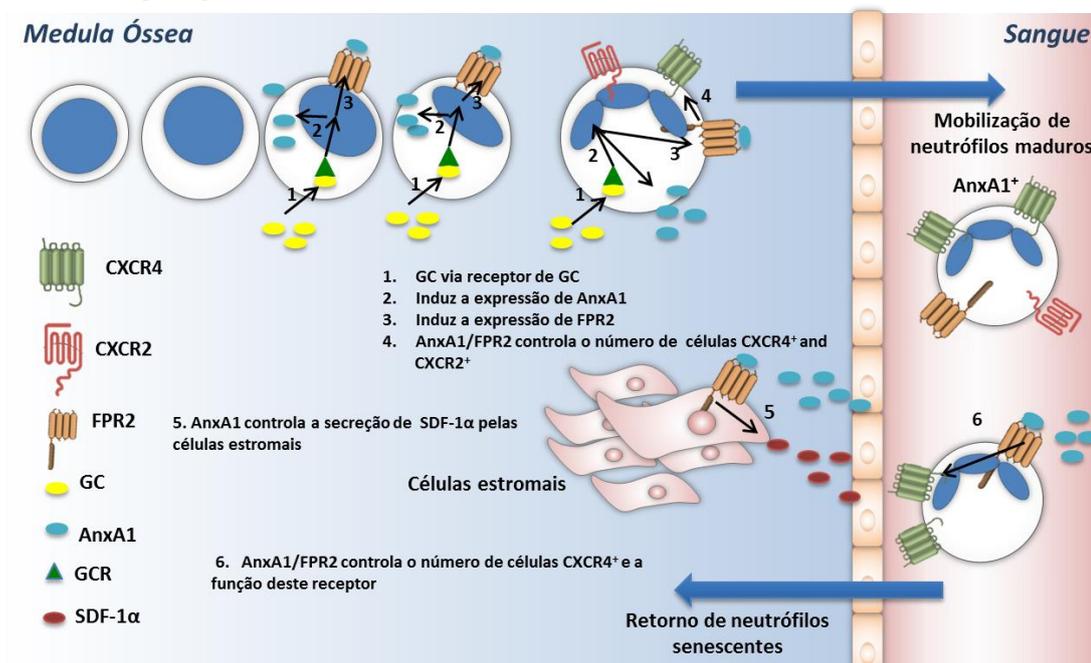
Não há dados na literatura quanto a relação do eixo SDF-1 α /CXCR4 e o controle do tráfego de neutrófilos exercido pelos GCs. Somente foi demonstrado que doses farmacológicas de GCs aumentaram a expressão e sinalização de CXCR4 em linfócitos, levando ao aumento da proliferação, polimerização de actina, ativação da Rac e migração celular em resposta ao SDF-1 α (WANG et al., 1998; CURNOW et al., 2004; GHOSH et al., 2009; MOUSTAKI et al., 2011). Com base nos resultados

aqui obtidos e ao fato da ANXA1 ser secretada em resposta a ação de GCs, pode-se sugerir que o eixo SDF-1 α /CXCR4 pode ser uma importante via de controle dos GCe no tráfego de neutrófilos (Figura 15).

Corroborando a hipótese de que a ANXA1 controla a meia vida dos neutrófilos, tem sido demonstrado que a ANXA1 e seus peptídeos bioativos induzem a apoptose de neutrófilos em diferentes fases do processo inflamatório (VAGO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013; DALLI et al., 2013). No entanto, o papel fisiológico da ANXA1 na indução da apoptose ainda não foi completamente estabelecido. Apenas DALLI et al. (2012a) mostraram número elevado de neutrófilos apoptóticos na medula óssea, o que pode refletir a diminuição da fagocitose por macrófagos residentes.

É importante ressaltar que dados publicados recentemente quebram paradigmas sobre a produção de neutrófilos, tempo de vida, localização e funções, sugerindo que os neutrófilos são células com plasticidade fenotípica de acordo com os estímulos a que são submetidas (LI & NG, 2012; BEYRAU et al., 2012). O controle molecular desta plasticidade não está totalmente compreendido, e nossos resultados sugerem que a ANXA1 possa ser uma proteína relevante para estes processos.

Figura 15. Esquema representativo dos resultados obtidos que mostram a modulação da ANXA1 no tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue através da regulação do eixo SDF-1 α /CXCR4.



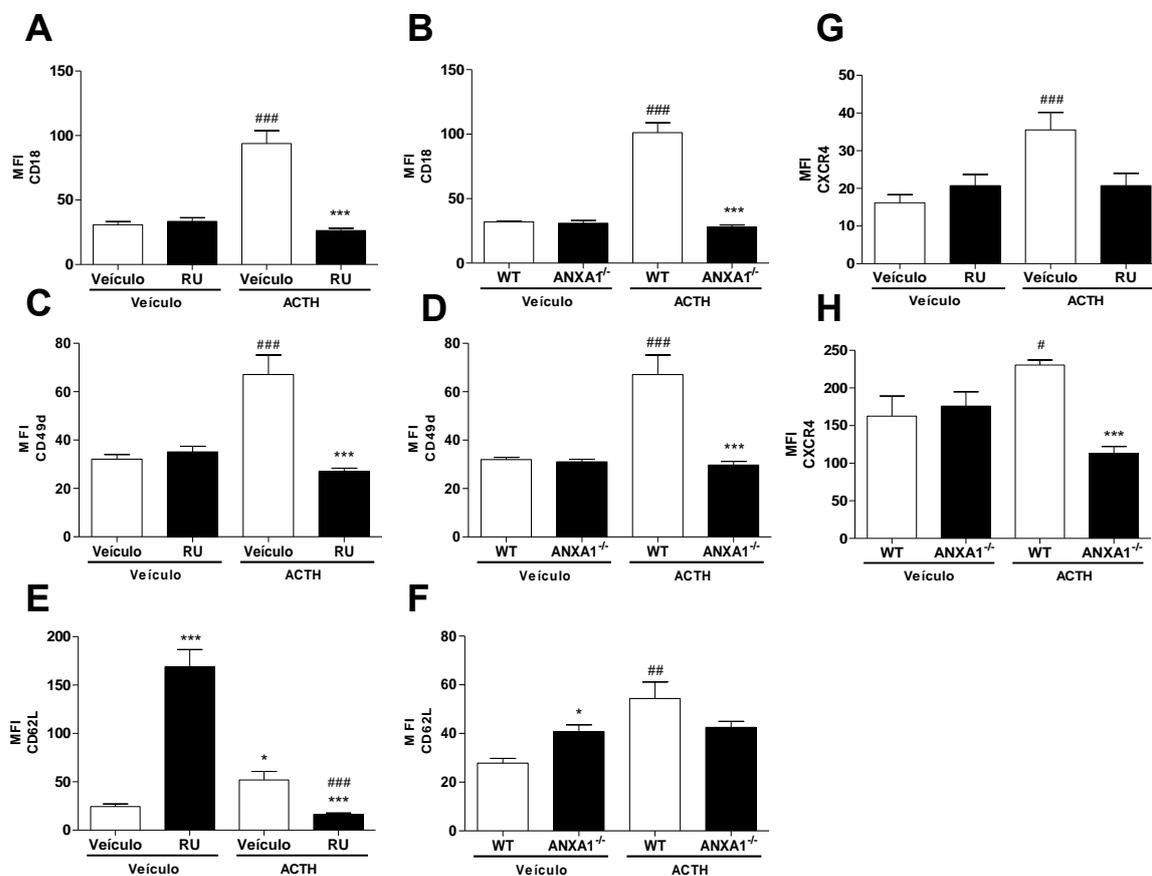
4.3 SEÇÃO 3: Alterações moleculares em neutrófilos do sangue mobilizados pelo ACTH

4.3.1 ACTH, via GR e ANXA1, altera a expressão de moléculas de adesão e do receptor CXCR4 em neutrófilos do sangue periférico

Como mostrado na seção anterior, o tratamento *in vivo* com ACTH aumentou significativamente a concentração de corticosterona circulante nos animais tratados com veículo, com RU 38486 e em animais nocautes para ANXA1. No entanto, nos animais ANXA1^{-/-} os níveis basais de corticosterona foram menores em relação aos valores encontrados nos animais selvagens e, da mesma forma, a administração de ACTH não elevou os níveis deste hormônio na circulação de maneira equivalente aos observado em animais selvagens (Tabela 1, página 54, seção 1).

Nestas condições, observou-se rápida mobilização de neutrófilos maduros da medula óssea para o sangue, acarretando neutrofilia (dados não mostrados). A análise dos marcadores de membrana destas células mostrou que os neutrófilos da circulação apresentaram maior expressão das moléculas de adesão CD18, CD49d e CD62L em animais tratados com ACTH (Figura 16). No entanto, nenhuma alteração foi detectada na expressão de moléculas de adesão em células da medula óssea (dados não mostrados). As alterações encontradas na expressão das moléculas de adesão CD18 e CD49d em neutrófilos circulantes de animais tratados com ACTH foram revertidas pelo pré-tratamento com RU 38486 e em animais deficientes de ANXA1, sugerindo que os efeitos são modulados pelos GCe e ANXA1. Por outro lado, os neutrófilos coletados de animais ANXA1^{-/-} apresentaram maior expressão de CD62L por célula em comparação aos animais selvagens, entretanto, o tratamento com ACTH reverteu a expressão desta molécula em neutrófilos coletados de animais pré-tratados com RU 38486 e em ANXA1^{-/-}, sugerindo que o ACTH possa atuar independentemente de GCe e ANXA1 (Figura 16).

Figura 16. Expressão de moléculas de adesão e do receptor CXCR4 em neutrófilos do sangue periférico de camundongos Balb/C selvagens e ANXA1^{-/-} tratados com ACTH.



Foram empregados camundongos Balb/C selvagens (WT) tratados RU38486 (RU; 10mg/kg, i.p.) ou veículo 24 e 2 horas antes da injeção peritoneal de ACTH (5 µg/animal, i.p) ou veículo e camundongos ANXA1^{-/-}. Os animais foram anestesiados, o sangue periférico foi coletado da aorta abdominal. As expressões de moléculas de adesão e do receptor CXCR4 foram quantificadas por citometria de fluxo. (A e B) expressão de CD18, (C e D) expressão de CD49d, (E e F) expressão de CD62L, (G e I) expressão de CXCR4 em neutrófilos do sangue periférico. Os resultados representam a média da expressão ± e.p.m. de células coletadas de 06 animais em cada grupo. *p<0,05 e ***p<0,001 vs respectivo veículo; #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 vs respectivo controle.

Os animais selvagens tratados com ACTH apresentaram maior expressão de CXCR4⁺ por célula no sangue periférico (Figura 16G) e este efeito foi revertido em neutrófilos de animais pré-tratados com RU 38486 ou na ausência de ANXA (Figura 16G e I, respectivamente).

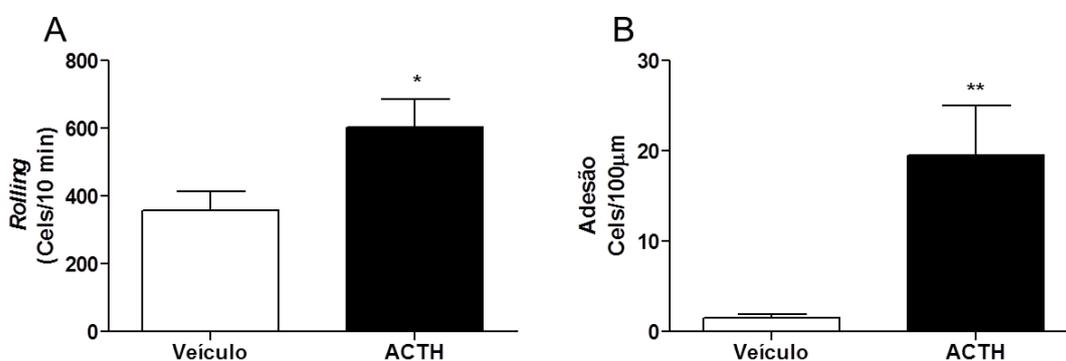
Vale ressaltar que os neutrófilos mobilizados da medula óssea para o sangue pela ação do ACTH possuem um perfil diferente e um aumento na expressão de ANXA1, no entanto, a expressão de ANXA1 em neutrófilos da medula óssea foi menor em relação ao grupo veículo (Figura 11). No entanto, não é possível saber em qual população de neutrófilos na circulação ocorrem as alterações nas

expressões de CD18, CD49d, CD62L ou de CXCR4, se estas são nas células recém migradas ou em células já circulantes.

4.3.2 ACTH modula a interação leucócito-endotélio e a migração de neutrófilos do sangue periférico para o tecido em condições inflamatórias

Para avaliar o comportamento dos neutrófilos na circulação na vigência de ação do ACTH foram utilizados ensaios *in vitro* e *in vivo*. Assim, a avaliação do comportamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster em animais tratados com ACTH ou veículo pode ser observada pela técnica de microscopia intravital. Em condições não inflamatórias, ou seja, sem estímulo tóxico, animais tratados com ACTH apresentaram aumento no número de leucócitos *rollers* e aderidos ao endotélio vascular quando comparados aos tratados com veículo (Figuras 17 A e B).

Figura 17. Efeito do ACTH na interação leucócito-endotélio *in vivo* por microscopia intravital.

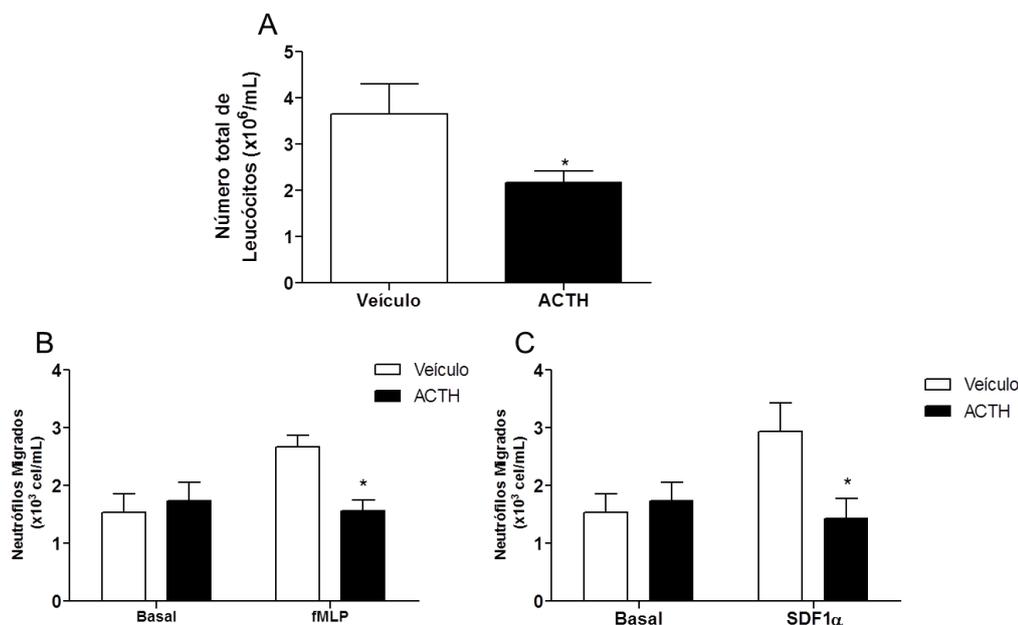


Foram empregados camundongos Balb/C selvagens tratados com ACTH (5 µg/animal, i.p) ou veículo 4 horas antes do experimento. (A) número de leucócitos em processo de rolling e (B) número de leucócitos aderidos ao endotélio, Os resultados expressam a média ± e.p.m de células coletas de 06 animais em cada grupo. *p<0,05 e **p<0,01 vs respectivo veículo.

O ensaio de inflamação subcutânea induzida por LPS no modelo de bolsa de ar mostrou que animais que receberam ACTH apresentaram menor número de leucócitos no exsudato inflamatório após 4 horas da indução da inflamação (Figura 18A). Corroborando o resultado obtido *in vivo*, o ensaio de quimiotaxia *in vitro*, utilizando como agentes quimiotáxicos fMLP ou SDF-1α mostrou que neutrófilos

obtidos de animais tratados com ACTH apresentam menor migração orientada frente a estes estímulos (Figura 18B e C).

Figura 18. Efeito do ACTH na migração de leucócitos *in vivo* e na quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos do sangue periférico de camundongos Balb/C selvagens.

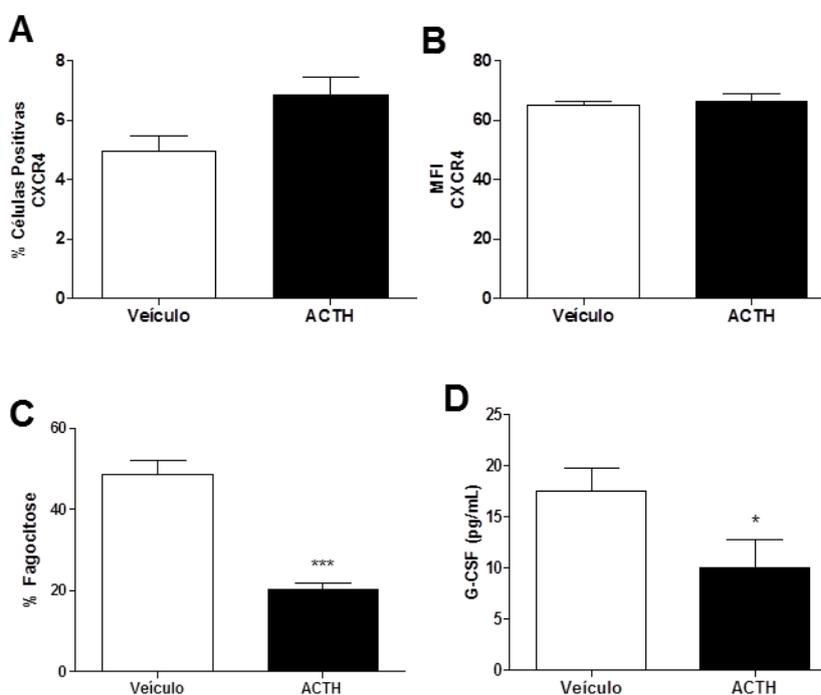


Foram empregados camundongos Balb/C selvagens tratados com ACTH (5 $\mu\text{g}/\text{animal}$, i.p) ou veículo 4 horas antes do experimento. (A) número total de leucócitos migrados no modelo de bolsa de ar induzida por LPS, (B) quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos obtidos do sangue periférico em resposta ao fMLP, (C) quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos obtidos do sangue periférico em resposta ao SDF-1 α . Os resultados expressam a média \pm e.p.m. de células coletadas de 06 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ vs respectivo veículo.

4.3.3 ACTH modula a atividade fagocítica de macrófagos medulares

De acordo com a redução da quimiotaxia de neutrófilos do sangue periférico frente ao SDF-1 α poderia se esperar menor número de neutrófilos CXCR4⁺ na medula óssea, no entanto os animais tratados com ACTH apresentaram número de neutrófilos CXCR4⁺ equivalente ao grupo controle (Figura 19A e B). Como já salientado, a fagocitose por macrófagos medulares é importante na regulação da granulopoiese, pois após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz a secreção de G-CSF. Para tanto, foi avaliada a fagocitose de neutrófilos apoptóticos *in vitro*. Os macrófagos medulares coletados de animais tratados com ACTH apresentaram redução na fagocitose de neutrófilos apoptóticos (Figura 19C) e redução dos níveis de G-CSF perfusato medular (Figura 19D).

Figura 19. Efeito do ACTH sobre a expressão de CXCR4 em células da medula óssea, atividade fagocítica de neutrófilos apoptóticos por macrófagos medulares e secreção de G-CSF.



Foram empregados camundongos Balb/C selvagens (WT) tratados com ACTH (5 µg/animal, i.p) ou veículo. 4 horas após a administração de ACTH, os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM para obtenção dos leucócitos do compartimento medular. As expressões dos receptores foram quantificadas por citometria de fluxo. (A e B) % de células CXCR4⁺ e expressão por célula (MFI) na medula óssea, respectivamente, (C) fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos medulares e (D) secreção de G-CSF por macrófagos medulares durante o ensaio de fagocitose *in vitro*. Os resultados expressam a média ± e.p.m de células coletadas de 06 animais em cada grupo. *p<0,05, e ***p<0,001 vs respectivo veículo.

4.3.4 Discussão

Por meio de interferência farmacológica ou gênica, neste trabalho mostramos que a administração do ACTH causa neutrofilia e muda o fenótipo de neutrófilos na circulação, sendo que nem todos os efeitos observados são dependentes da elevação da concentração de GCe e da secreção da ANXA1.

Os dados aqui obtidos confirmaram que a administração de ACTH causa neutrofilia, pela mobilização de células ANXA1⁺. No entanto, apesar do ACTH causar aumento na concentração de corticosterona circulante, não foi possível avaliar se este efeito é dependente de GCe ou de ANXA1, uma vez que animais tratados com RU 38486 ou ANXA1^{-/-} apresentam neutrofilia. No entanto, neste

trabalho, mostramos, pela primeira vez, que a administração de ACTH muda o fenótipo dos neutrófilos na circulação e que as modificações observadas nem sempre são dependentes de GCe e ANXA1. Neste sentido, mostramos que neutrófilos de animais tratados com ACTH são CD18⁺, CD49d⁺, CD62L⁺ e CXCR4⁺ e que as ações na expressão de CD62L são independentes de GCe e ANXA1. O papel dos GCs sobre as expressões das integrinas é controverso na literatura (LARANGEIRA et al., 2001; BURDON et al., 2005) e as ações do ACTH sobre estas moléculas são escassas. Há evidências que a ação anti-inflamatória dos GCs se dá pela modulação da expressão de CD18 (SCHARMM & THORLACIUS, 2004). No entanto, no estudo de Dale et al. (1998) e Rahmoun et al. (2006), pacientes tratados com GCs apresentaram aumento na expressão de CD18 e CD49d em linfócitos e neutrófilos, porém o tratamento *in vitro* com dexametasona não alterou a expressão destas moléculas de adesão. Ainda, dados de Piemonti et al. (1999) mostraram que células dendríticas tratadas *in vitro* com dexametasona tiveram uma maior expressão de CD18. Enquanto, Filep et al. (1997) não observaram alterações na expressão de CD18 em neutrófilos obtidos de pacientes tratados com dexametasona. Contrariamente, no estudo de Yazawa et al. (1999) e Torsteinsdottir et al. (1999) os tratamentos com ACTH e GCs sintéticos reduziram a expressão de CD18 e CD49d em neutrófilos e eosinófilos humanos. Burton et al. (1995) mostraram que o tratamento com dexametasona reduziu a expressão de CD18 em neutrófilos de bovinos. Por outro lado, a ação dos GCe e da ANXA1 sobre a expressão de CD62L está bem estabelecida. De fato estudos *in vitro* mostram que os GCe, via ANXA1, modulam a expressão de CD62L em neutrófilos circulantes, por um mecanismo mediado pela clivagem dessa molécula da membrana celular (STRAUSBAUGH & ROSEN, 2001; DE COUPADE et al., 2003; HAYHOE et al., 2006). No entanto, na vigência de ação do ACTH, este padrão parece ser modificado, indicando uma ação própria do mesmo. O mecanismo pelo qual o ACTH exerce este efeito *in vivo* não está esclarecido e duas hipóteses podem ser propostas com base nos mecanismos que regem a expressão de CD62L na membrana celular, a saber: ou o ACTH afeta a expressão gênica da molécula, ou estimula a sua clivagem da membrana pela ativação de ADAM-17 (GOOZ, 2010; SCHELLER et al., 2011). A ação dos GCe e da ANXA1 sobre a expressão de CXCR4 foi mostrado pela primeira vez pelo nosso grupo (DALLI et al., 2012a; MACHADO et al., submetido) e, os dados aqui apresentados, sugerem que

concentrações elevadas de GCE induzem a expressão de CXCR4, mediado pela ANXA1.

Uma vez que o fenótipo de neutrófilos obtidos após a administração de ACTH foi alterado, com modificações nas expressões das moléculas de adesão, consideramos interessante avaliar o comportamento destas células na microcirculação. Os ensaios de microscopia intravital mostraram aumento da interação leucócito-endotélio na rede microvascular do mesentério dos animais tratados com ACTH, na ausência de aplicação tópica de estímulo inflamatório. De fato, estes dados podem confirmar o perfil de expressão de moléculas de adesão nestas células, uma vez que como já mencionado, a CD62L medeia o *rolling* (ROGOWSKI et al., 1998; SUNDD et al., 2012; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013), a CD18 e CD49d medeiam a adesão de leucócitos ao endotélio (LEY et al., 2007; ETZIONI, 2009; HERTER & ZARBOCK, 2013).

A interação leucócito-endotélio é o passo fundamental e inicial para a migração de células para o tecido inflamado e para migração de células senescentes para os tecidos de *clearance*. Desta forma, poder-se-ia esperar maior influxo de neutrófilos para o foco de lesão. No entanto, o tratamento com ACTH reduziu o número de leucócitos migrados para a cavidade da bolsa de ar na vigência de inflamação subcutânea induzida por LPS. Já foi demonstrado que o ACTH exerce ação anti-inflamatória por atuar em receptores de MC3-R (GETTING et al., 1999), inibindo a secreção de mediadores químicos. Foi mostrado por Getting e Perretti (2001) que o ACTH modula a resposta inflamatória de maneira independente de corticosterona por atuar em MC3-R de macrófagos peritoneais, inibindo a secreção de citocinas e, a subsequente migração de neutrófilos (para revisão ver PATEL et al., 2010). Ainda, um trabalho realizado pelo mesmo grupo, mostrou que o ACTH possui atividade anti-inflamatória própria no modelo de artrite em ratos, atuando seletivamente nos receptores MC3-R (GETTING et al., 2002). Assim, a menor migração de neutrófilos para a bolsa de ar poderia ser decorrente de menores concentrações de mediadores secretados por macrófagos residentes em animais tratados com ACTH. No entanto, nós acrescentamos um mecanismo a mais neste efeito, uma vez que os neutrófilos da circulação destes animais apresentaram migração reduzida *in vitro* frente ao fMLP mostrando, claramente, que os neutrófilos com fenótipo modificado pela administração de ACTH perdem a capacidade de locomoção orientada. O mecanismo desta alteração não está esclarecido, mas pode

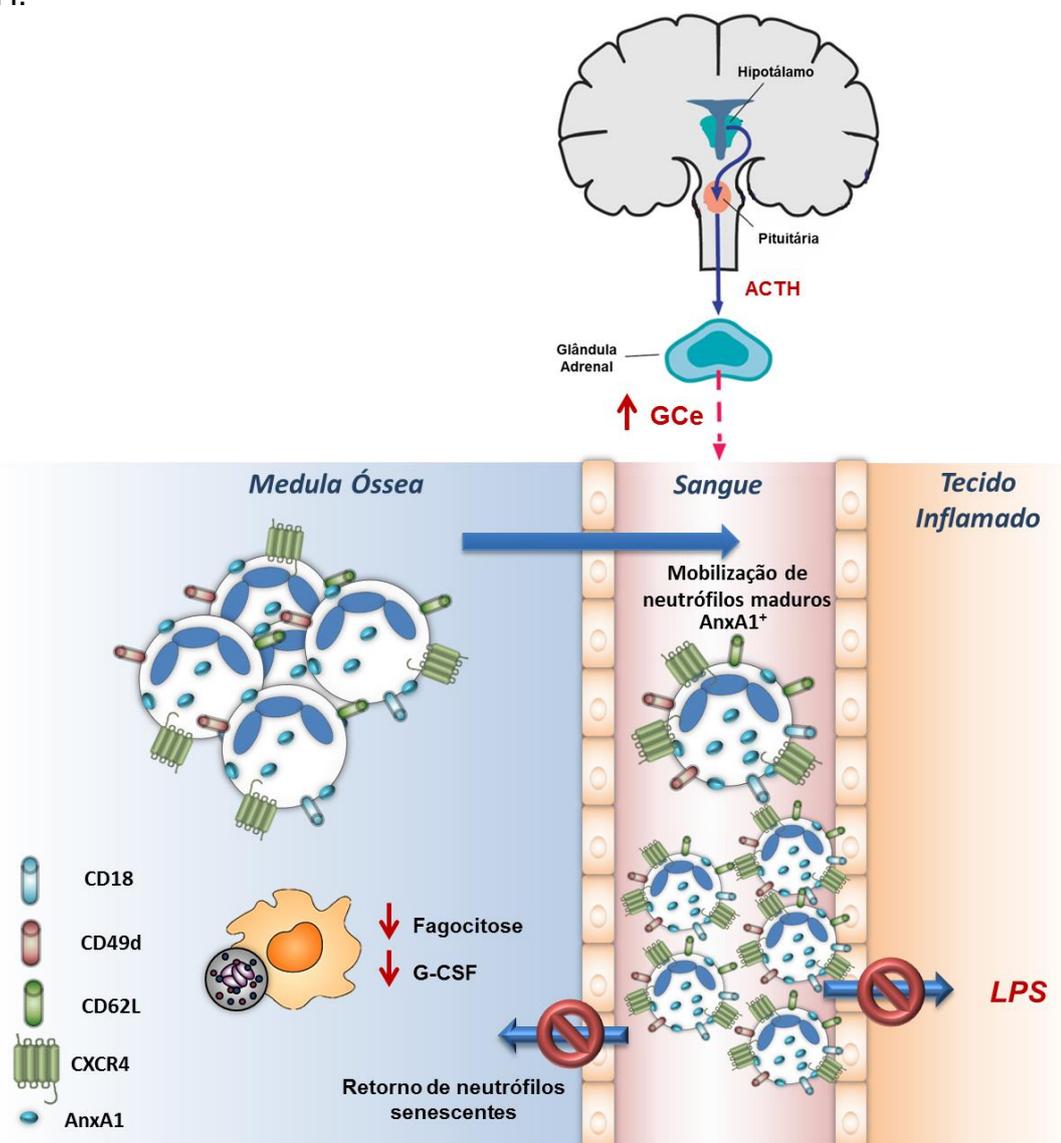
sugerir que estes neutrófilos apresentem redução de expressão ou alteração na sensibilidade do receptor FPR1, ou seja, dependente de modificações intracelulares. Na tentativa de esclarecer esta hipótese, neutrófilos dos animais serão ensaiados frente ao LTB₄, um fator quimiotático para granulócitos que atua em receptores BLT1 ou BLT2, os quais, a exemplo do FPR1, são receptores acoplados a proteína G (Harvath, 1991; Toda et al., 2002).

Da mesma forma que o observado para fMLP, a quimiotaxia de neutrófilos circulantes de animais tratados com ACTH em resposta ao SDF-1 α estava reduzida, embora a expressão de CXCR4 na membrana dos neutrófilos estivessem aumentadas. Estes dados, em conjunto, mostram que estes neutrófilos possuem ineficácia na ação do receptor. O receptor CXCR4 é um receptor acoplado a proteína G com 7 domínios transmembrana e é expresso por neutrófilos, progenitores CD34⁺, megacariócitos, plaquetas, linfócitos B, linfócitos T e células mononucleares fagocíticas (MARTIN et al., 2003; MARTIN et al., 2006).

Uma vez que a quimiotaxia de neutrófilos CXCR4⁺ em resposta ao SDF-1 α da medula óssea é mecanismo de *clearance* de neutrófilos senescentes, verificamos o número de neutrófilos CXCR4 na medula óssea dos animais tratados com ACTH. Tanto o número, quanto a expressão do receptor CXCR4 em neutrófilos do compartimento medular de animais tratados com ACTH foram semelhantes aos observados no grupo veículo. Estes dados poderiam sugerir que a migração para medula óssea estaria normal nestes animais. No entanto, os dados subsequentes sugerem que a não alteração no número de neutrófilos CXCR4⁺ na medula óssea seja devido a uma menor fagocitose destas células por macrófagos residentes da medula óssea, pois verificamos menor atividade fagocítica de neutrófilos apoptóticos por macrófagos medulares, bem como menor secreção de G-CSF no perfusato medular de animais tratados com ACTH.

Os resultados aqui obtidos ampliam os mecanismos de controle do tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico e mostram que a administração do ACTH altera o fenótipo de neutrófilos circulantes, que afeta o seu comportamento na circulação e no tráfego para os tecidos (Figura 20).

Figura 20. Esquema representativo dos resultados obtidos que mostram as alterações fenotípicas em neutrófilos do sangue periférico mobilizados pela ação do ACTH.



4.4 SEÇÃO 4: Mecanismos de controle da ANXA1 e dos GCe sobre o tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue na vigência de inflamação

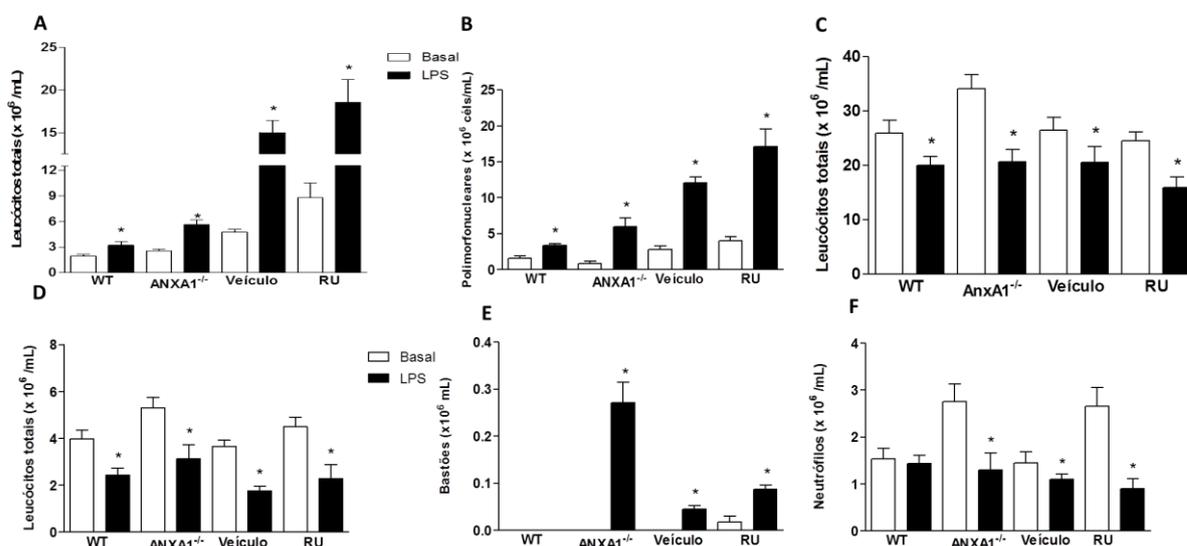
4.4.1 Efeito do bloqueio do GR e da ANXA1 sobre a migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzido pelo LPS

Com o objetivo de avaliar o efeito dos GCe e da ANXA1 no tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico, bem como a modulação da expressão de moléculas de adesão e dos eixos SDF-1 α /CXCR4 e IL-17/IL-23/ G-CSF na vigência de inflamação, avaliamos os números de granulócitos na medula, de neutrófilos no sangue e no peritônio inflamado pelo LPS nos animais tratados com RU 38486 ou ANXA1^{-/-}, e em seus respectivos controles. O bloqueio do GR e a ausência de ANXA1 ocasionaram a exacerbação do processo inflamatório quando comparado com os grupos controles, uma vez que pode ser observado o aumento do número total de leucócitos (Figura 21A) e do número de neutrófilos (Figura 21B) no lavado peritoneal.

O conseqüente recrutamento de neutrófilos para o foco de inflamação mais intenso em animais tratados com RU 38486 ou ANXA1^{-/-}, levou a redução do número de leucócitos totais na circulação, que foi equivalente em todos os grupos estudados (Figura 21D). No entanto, a análise diferencial destas células mostrou que em animais tratados com RU 38486 ou ANXA1^{-/-} houve mobilização de neutrófilos jovens, que não foi observado nos respectivos controles (Figura 21E). Ainda, detectou-se redução acentuada no número de neutrófilos maduros em animais tratados com RU 38486 e em animais deficientes de ANXA1 (Figura 21F).

A Figura 21C mostra que em todos os grupos de animais estudados houve diminuição do número total de leucócitos na medula, que pode ser decorrente da rápida mobilização de neutrófilos maduros para o sangue periférico na vigência de resposta inflamatória.

Figura 21. Efeito do tratamento *in vivo* com o RU 38486 e da deficiência de ANXA1 sobre a inflamação aguda no peritônio induzida por LPS.



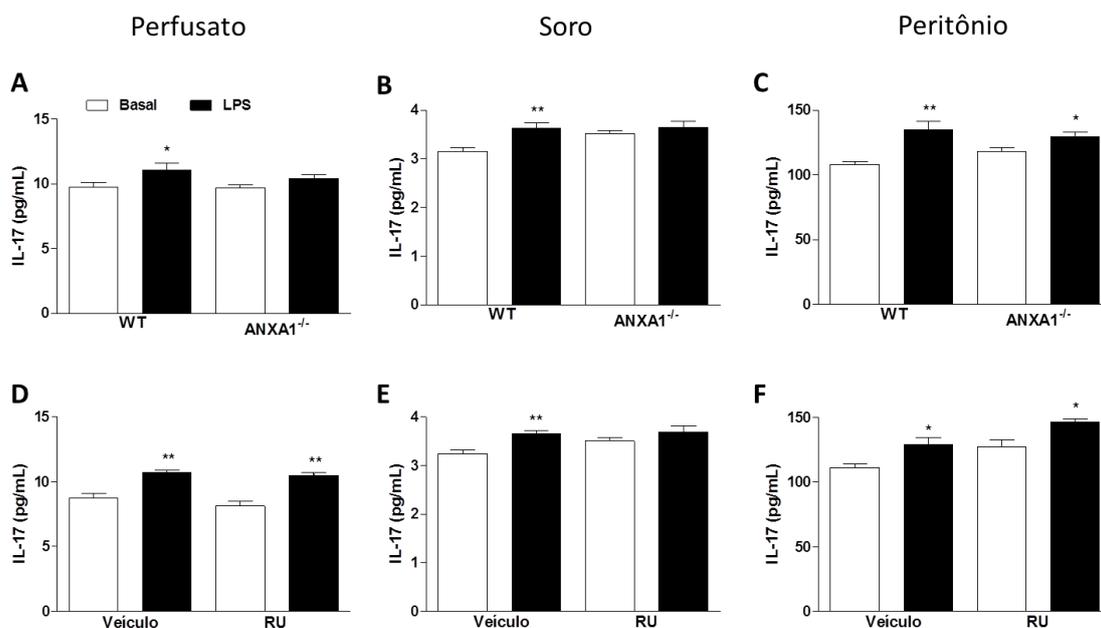
(A) Número total de leucócitos e (B) polimorfonucleares no lavado peritoneal; (C) número total de leucócitos na medula óssea; (D) Número total de leucócitos, (E) bastões e (F) neutrófilos no sangue periférico de camundongos Balb/C deficientes de ANXA1 e animais tratados com RU 38486 (10 mg/kg, 24 horas e 2 horas antes da injeção intraperitoneal de LPS (100 µg/Kg) ou veículo. Os animais foram anestesiados 4 horas após a injeção de LPS, o sangue circulante foi coletado da aorta abdominal, o canal medular foi perfundido com meio DMEM para obtenção dos leucócitos do compartimento medular e a cavidade abdominal dos animais foi lavada para obtenção das células do peritônio. Os dados representam os valores de média ± e.p.m. de 5 animais. *p<0,05 vs LPS.

4.4.2 Efeitos da ANXA1 e do bloqueio do receptor citosólico de GCs sobre o eixo IL-17/IL-23/G-CSF

O eixo IL-17/IL-23/G-CSF é bastante relevante em condições inflamatórias, já que este eixo modula a granulopoiese e o tráfego de neutrófilos na inflamação (GORDY et al., 2011), no entanto o papel do receptor citosólico de GCs e da ANXA1 sobre este eixo não está descrito. Assim, na vigência do processo inflamatório agudo de peritonite foi observado aumento significativo de IL-17 no perfusato de medula óssea, no soro e no lavado peritoneal de animais selvagens, os quais apresentaram perfil distinto em animais ANXA1^{-/-} (Figura 22). Nestes animais não foram observadas alterações no perfusato medular, no entanto, no soro a concentração basal já está aumentada, embora sem diferença estatística, e o aumento da concentração no peritônio, embora menor que a observada em animais selvagens.

Em animais selvagens tratados com o antagonista de GR, RU38486, há aumento na concentração da citocina após a inflamação somente no perfusato de medula óssea e no exsudato peritoneal (Figura 22).

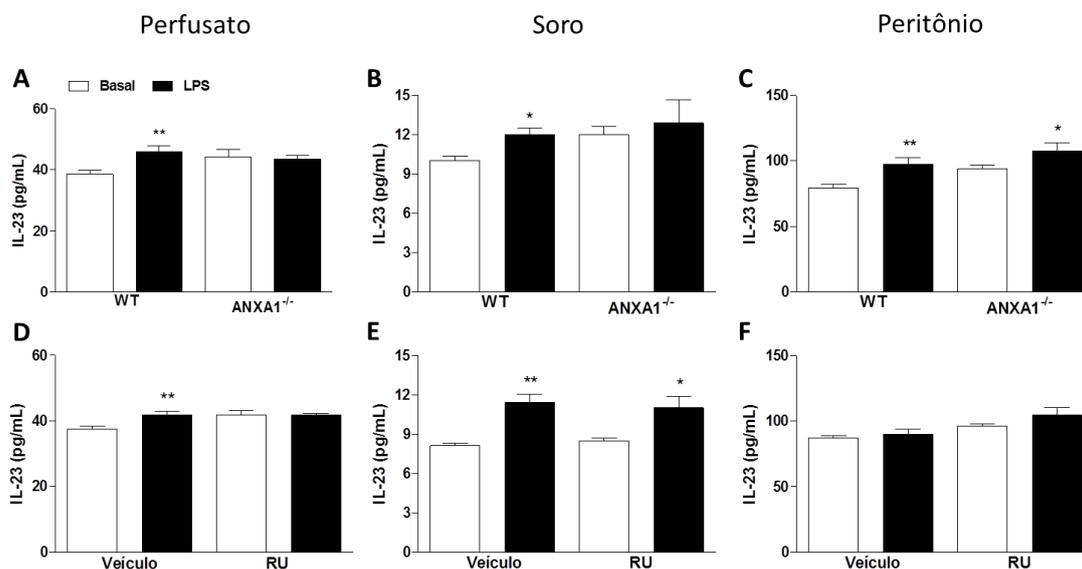
Figura 22. Concentração de IL-17 no perfusato medular, soro e peritônio de animais nocautes ANXA1^{-/-} ou camundongos Balb/C selvagens tratados com RU 38486.



Camundongos Balb/C selvagens (WT) foram tratados RU38486 (RU; 10mg/kg, i.p.) ou veículo 24 e 2 horas antes da injeção peritoneal de LPS (100 µg/Kg) ou veículo, também foram empregados animais Balb/C selvagens e ANXA1^{-/-}. 4 horas após a administração de LPS, os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM, o sangue foi obtido da artéria subclávia e cavidade abdominal foi lavada com PBS. A quantificação de IL-17 foi realizada nas amostras por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 6 animais em cada grupo. *p<0,05 e **p<0,01 em relação aos valores obtidos no grupo veículo.

Da mesma forma que para a IL-17, os animais selvagens apresentaram aumento significativo de IL-23 no perfusato de medula óssea, no soro e no exsudato peritoneal após a indução da peritonite (Figura 23). Os animais ANXA1^{-/-} não apresentaram alterações na secreção de IL-23 nos compartimentos estudados, embora, de maneira semelhante ao observado para IL-17, a concentração de IL-23 parece estar elevada nestes animais em condições basais. Em animais tratados com RU 38486 observou-se somente aumento de IL-23 no soro de animais, semelhantemente ao observado em animais selvagens (Figura 23).

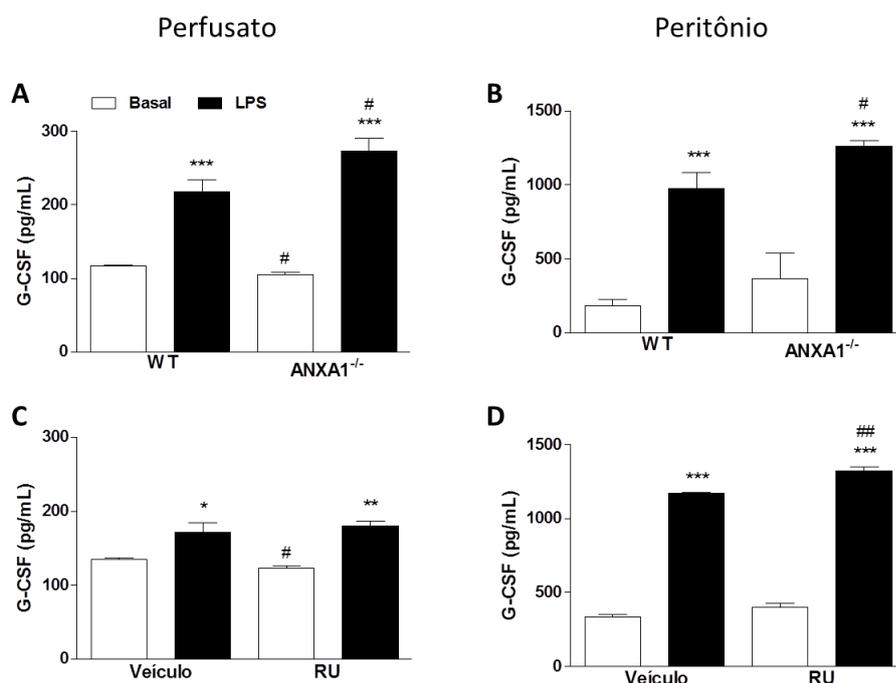
Figura 23. Concentração de IL-23 no perfusato medular, soro e peritônio de animais nocautes ANXA1^{-/-} ou camundongos Balb/C selvagens tratados com RU 38486.



Camundongos Balb/C selvagens (WT) foram tratados RU38486 (RU; 10mg/kg, i.p.) ou veículo 24 e 2 horas antes da injeção peritoneal de LPS (100 µg/Kg) ou veículo, também foram empregados animais Balb/C selvagens e ANXA1^{-/-}. 4 horas após a administração de LPS, os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM, o sangue foi obtido da artéria subclávia e cavidade abdominal foi lavada com PBS. A quantificação de IL-23 foi realizada nas amostras por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 6 animais em cada grupo. *p<0,05 e **p<0,01 em relação aos valores obtidos no grupo veículo.

A indução do processo inflamatório agudo promoveu aumento dos níveis de G-CSF no perfusato medular e lavado peritoneal em todos os grupos de animais estudados (Figura 24). Em conjunto, os dados obtidos mostram que a ANXA1 e o GR não afetam a secreção de IL-17, IL-23 e G-CSF na fase aguda a resposta inflamatória.

Figura 24. Concentração de G-CSF no perfusato medular e peritônio de animais ANXA1^{-/-} ou camundongos Balb/C selvagens tratados com RU 38486.

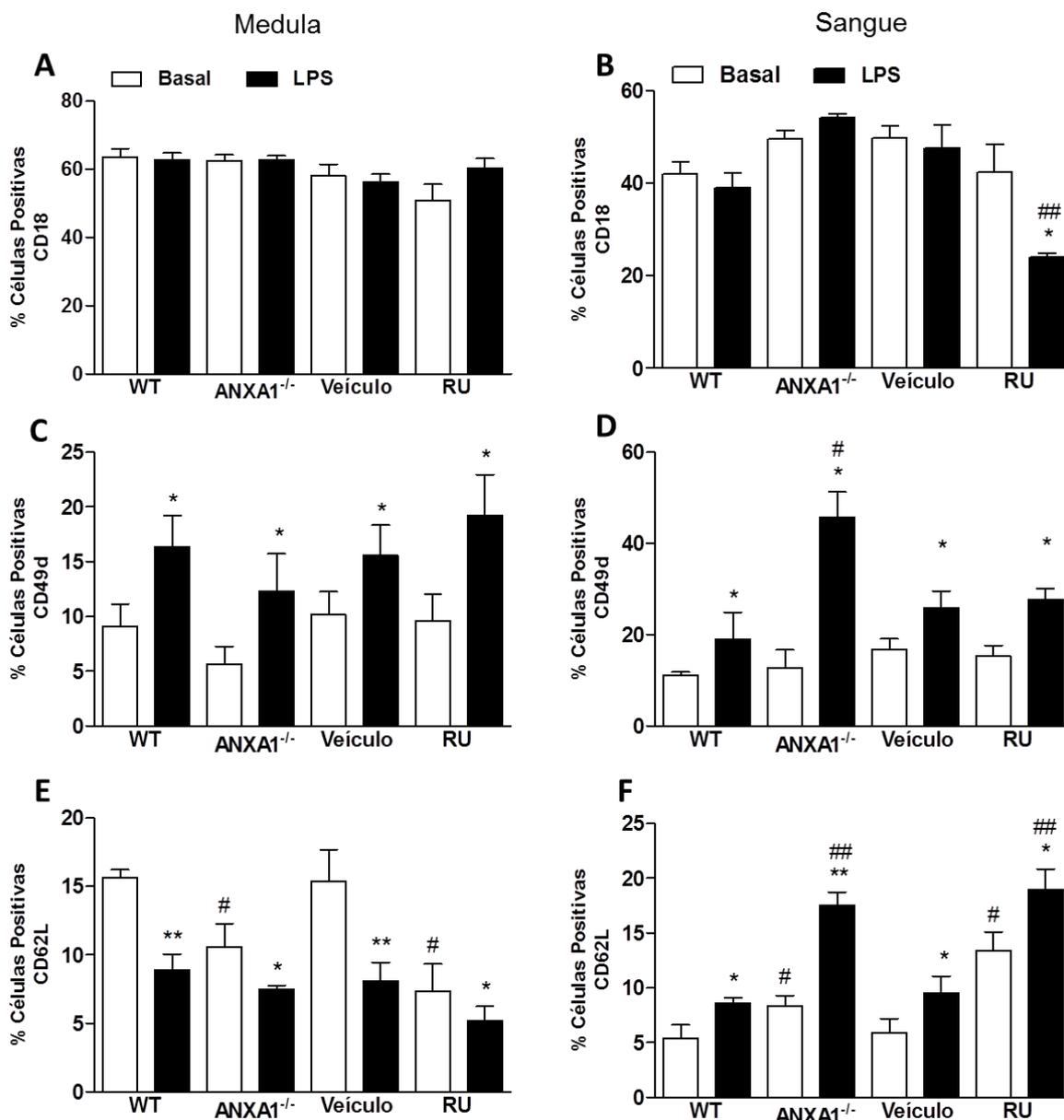


Camundongos Balb/C selvagens (WT) foram tratados com RU38486 (RU; 10mg/kg, i.p.) ou veículo 24 e 2 horas antes da injeção peritoneal de LPS (100 µg/Kg) ou veículo, também foram empregados animais Balb/C selvagens e ANXA1^{-/-}. 4 horas após a administração de LPS, os animais foram anestesiados e o canal medular foi perfundido com meio DMEM, o sangue foi obtido da artéria subclávia e cavidade abdominal foi lavada com PBS. A quantificação de G-CSF foi realizada nas amostras por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 6 animais em cada grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação aos valores obtidos no grupo veículo; #p<0,05 e ##p<0,01 em relação ao respectivo grupo controle.

4.4.3 Efeito do bloqueio do GR e da ANXA1 sobre a expressão de CD62L, CD49d e CD18 em neutrófilos da medula óssea e neutrófilos do sangue periférico no modelo de peritonite induzida pelo LPS

Os resultados apresentados na Figura 25 mostram que em condição inflamatória houve modificação no perfil de células na medula óssea e no sangue periférico quanto à expressão de moléculas de adesão. Foi observado que a população na medula apresenta maior número de células CD49d⁺ e menor número de células CD62L⁺. Nenhuma modificação foi observada quanto ao perfil de células CD18. Na circulação o neutrófilo é preferencialmente uma célula CD49d⁺, mas também passa a ser CD62L⁺. No entanto, somente no animal tratado com RU 38486 observou-se redução significativa na população CD18⁺.

Figura 25. Expressão de CD18, CD49d e CD62L em neutrófilos da medula óssea e no sangue de camundongos Balb/C selvagens tratados com RU 38486 e ANXA1^{-/-}.



Foram empregados camundongos Balb/C selvagens (WT) tratados RU38486 (RU; 10mg/kg, i.p.) ou veículo 24 e 2 horas antes da injeção peritoneal de LPS (100 µg/Kg) ou veículo e camundongos ANXA1^{-/-}. 4 horas após a administração de LPS, os animais foram anestesiados, o canal medular foi perfundido com meio DMEM e o sangue foi obtido da artéria subclávia. As expressões de moléculas de adesão foram quantificadas por citometria de fluxo. (A e B) % de neutrófilos CD18⁺, (C e D) % de neutrófilos CD49d⁺ e (E e F) % de neutrófilos CD62L⁺ na medula óssea e sangue periférico. Os resultados expressam a média ± e.p.m de células coletadas de 06 animais em cada grupo. *p<0,05 e **p<0,01 vs respectivo veículo; #p<0,05 e ##p<0,01 vs o respectivo grupo controle.

4.4.4 Discussão

Como está proposto no presente trabalho avaliar a modulação dos GCe e ANXA1 no eixo IL-17/IL-23/G-CSF na vigência de inflamação, foi necessário padronizar um modelo no laboratório focando a cinética de migração neutrofílica desde a medula até o tecido inflamado. Assim, avaliamos os números de granulócitos na medula, de neutrófilos no sangue e no peritônio inflamado pelo LPS nos animais tratados com RU 38486 ou ANXA1^{-/-} e em seus respectivos controles. Como já esperado, o bloqueio do GR e a ausência de ANXA1 levaram a exacerbação do processo inflamatório, uma vez que pode ser observado aumento do número total de leucócitos e neutrófilos no lavado peritoneal (LAZAR et al., 1992; HIRSCHMANN et al., 1998; CHATTERJEE et al., 2005; DAMAZO et al., 2006). Ainda, em animais ANXA1^{-/-} observou-se aumento acentuado na migração de células imaturas para o sangue, o que confirma dados deste trabalho e do nosso grupo em condições basais, que a ANXA1 é uma molécula importante no tráfego de neutrófilos da medula para o sangue periférico. Em conjunto, os dados obtidos em animais tratados com RU 38486 e deficientes em ANXA1 mostram rápida mobilização de granulócitos da medula óssea para o sangue circulante e deste compartimento para o local inflamatório.

Como já salientado, o eixo IL-17/IL-23/G-CSF representa uma importante via de controle da granulopoiese durante um processo inflamatório, porém sua influência na granulopoiese em condições fisiológicas, bem como a modulação pelos GCs e ANXA1 não estão esclarecidos e os dados na literatura são escassos. Em resposta a estímulos inflamatórios, macrófagos e células dendríticas residentes produzem IL-23, o que estimula secreção de IL-17 por células Th17 que, por sua vez, conduz a níveis elevados de G-CSF local e sistêmico o que, conseqüentemente, leva ao aumento da granulopoiese (LEY et al., 2006). No entanto, na resolução do processo inflamatório, durante a eferocitose, fagocitose de neutrófilos apoptóticos, os macrófagos teciduais secretam níveis reduzidos de IL-23, com conseqüente supressão da secreção de IL-17 por linfócitos T teciduais. A diminuição de IL-17 suprime a secreção sistêmica de G-CSF, o que leva a redução da granulopoiese e liberação de neutrófilos da medula óssea (STARK et al., 2005).

Os resultados obtidos mostraram que 4 horas após a indução da inflamação aumentou significativamente de IL-17 e IL-23 no perfusato de medula óssea, soro e

exsudato peritoneal de animais selvagens, o qual não foi observado em animais ANXA1^{-/-}. Diferentemente, em animais tratados com o antagonista de GR, após a inflamação, há aumento na concentração de IL-17 no perfusato de medula óssea e no exsudato peritoneal, e IL-23 no soro, semelhantemente ao observado em animais selvagens. Ainda, houve aumento marcado nas concentrações de G-CSF no perfusato medular e exsudato peritoneal após a inflamação em todos os grupos de animais estudados. Em conjunto, os dados obtidos mostram que na vigência de um processo inflamatório agudo, eixo IL-17/IL-23/G-CSF parece não ser alvo de ação da ANXA1 e do GR. No entanto, fica por ser estabelecido que este eixo pode ser modulado pela ANXA1 e GC em etapas mais tardias do processo, onde possivelmente possam ser detectadas diferenças mais significativa nas secreções dos mediadores químicos.

Já que o papel das moléculas de adesão no tráfego de neutrófilos da medula para o sangue não está esclarecida (KASSIRER et al., 1999; VAN EEDEN et al., 1997; BURDON et al., 2005), investigamos as expressões das mesmas em condições de inflamação. Os dados obtidos mostram que a população remanescente na medula óssea é preferencialmente CD49d⁺, além de uma população CD62L⁺. Infelizmente, pela nossa abordagem experimental não foi possível avaliar se estas populações são as mesmas, ou se são populações de célula distintas. A expressão de CD49d de acordo com Day & Link (2012) é dispensável na migração de granulócitos da medula para o sangue periférico em condições de homeostasia. No entanto, em uma condição de estresse, por exemplo, um estado inflamatório esta molécula parece contribuir para a liberação de neutrófilos da medula para o sangue (DAY & LINK, 2012). Uma vez que a CD49d é uma molécula relevante para a adesão dos neutrófilos aos sinusóides medulares (PEREIRA et al., 2001; BURDON et al., 2005) é possível que estas ainda estejam em processo de migração. Na mesma etapa de inflamação, os neutrófilos circulantes são também CD49d⁺, indicando que a molécula não é clivada no processo de migração para o sangue e que está apta a aderir ao endotélio do microambiente inflamado. No entanto, estes dados precisam ser melhor elucidados.

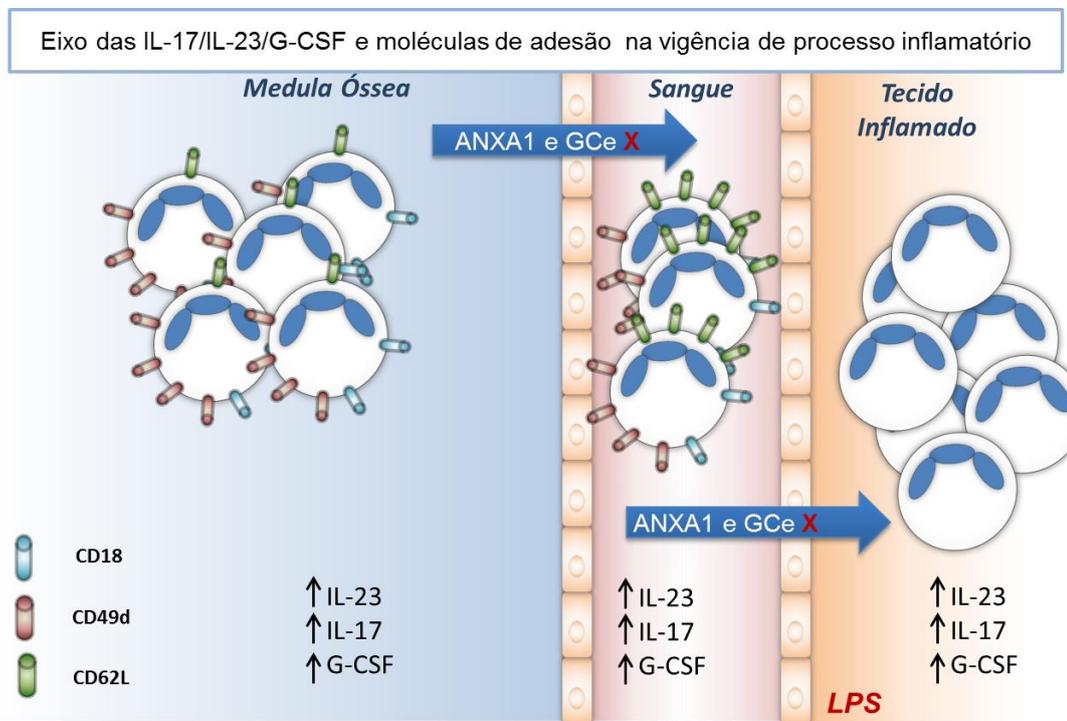
A CD62L é altamente expressa em células precursoras mielóides CD34⁺ e sua expressão é reduzida durante os estágios intermediários de maturação, sugerindo que esta molécula tenha um papel importante na compartimentalização e diferenciação de granulócitos (LUND-JOHANSEN & TERSTAPPEN, 1993;

KASSIRER et al., 1999). Ainda, tem sido proposto que a CD62L é clivada à medida que os granulócitos movem-se do compartimento hematopoiético para os sinusóides venosos da medula óssea e que este efeito é um pré-requisito para a mobilização de granulócitos para o sangue (VAN EEDEN et al., 1997; KASSIRER et al., 1999). Por outro lado, mais recentemente foi mostrado que a inibição da clivagem de CD62L não modificou o tráfego de neutrófilos para a circulação (BURDON et al., 2005).

Nossos experimentos mostram que na presença de processo inflamatório, a clivagem da CD62L participa da mobilização dos granulócitos da medula óssea para o sangue periférico, uma vez que houve diminuição da expressão desta molécula em todos os grupos avaliados quando comparados aos respectivos grupos basais. Este dado evidencia que a clivagem da CD62L em granulócitos da medula óssea, na vigência de inflamação, não é dependente da ação dos GcE e da ANXA1. Interessantemente, a população de neutrófilos CD62L⁺ está aumentada no sangue dos animais inflamados, mostrando que na circulação os neutrófilos passam a expressar moléculas, que com certeza, medeia o *rolling* no processo de migração para o tecido inflamado (ROGOWSKI et al., 1998; SUNDD et al., 2012; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Os resultados aqui apresentados mostram que o eixo IL-17/IL-23/GCSF participa da inflamação aguda induzida pelo LPS, mas parece que este eixo não é alvo de ação dos GcE e da ANXA1 nesta fase do processo inflamatório (Figura 26). Ainda, os dados obtidos nesta etapa do trabalho mostraram que a CD49d e CD62L são moléculas envolvidas no processo de migração de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico.

Figura 26. Esquema representativo dos resultados obtidos que mostram os mecanismos de controle da ANXA1 sobre o tráfego de neutrófilos da medula óssea para o sangue na vigência de inflamação.



5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- 1) Neutrófilos da medula óssea e sangue periférico expressam ANXA1 e o receptor FPR2 constitutivamente, e a expressão de ambos é regulada pelos GCe;
- 2) ANXA1 via receptor FPR2 expressos em células da medula óssea, controlam a maturação dos neutrófilos e o tráfego para o sangue;
- 3) O controle exercido pela ANXA1 sobre o eixo SDF-1 α /CXCR4 é dependente da interação da ANXA1 ao seu receptor de membrana FPR2;
- 4) ACTH causa neutrofilia e os neutrófilos mobilizados para o sangue são ANXA1⁺;
- 5) Os neutrófilos de animais tratados com ACTH são CD18⁺, CD49d⁺, CD62L⁺ e CXCR4⁺, e as ações do ACTH na expressão de CD62L são independentes de GCe e ANXA1;
- 6) ACTH altera o fenótipo dos neutrófilos circulantes, modificando o seu comportamento na circulação e o tráfego dos mesmos para os tecidos inflamados e de *clearance*;
- 7) A ausência da ação dos GCe e da ANXA1 determinam rápida mobilização dos granulócitos da medula óssea para o sangue circulante e deste compartimento para o foco de inflamação;
- 8) O eixo IL-17/IL-23/G-CSF participa do processo inflamatório agudo e parece não ser alvo de ação da ANXA1 e do GCe nesta etapa de reação inflamatória;
- 9) Na vigência de inflamação, as moléculas de adesão, CD49d e CD62L, estão envolvidas no processo de migração de neutrófilos da medula óssea para o sangue;

Paralelamente aos dados da literatura, os resultados obtidos aqui permitem concluir que os GCe e a ANXA1 são relevantes para a plasticidade fenotípica dos neutrófilos de acordo com os estímulos a que são submetidos, e podem auxiliar para compreensão de novos conceitos sobre a produção, tempo de vida, localização e funções dos neutrófilos.

6 REFERÊNCIAS

- ABE, R.; SHIMOSEGAWA, T.; KIMURA, K.; ABE, T.; KASHIMURA, J.; KOIZUMI, M. The role of endogenous glucocorticoids in rat experimental models of acute pancreatitis. **Gastroenterol.**, v. 109, p.933–943, 1995.
- ABRAHAM, G.; ALLERSMEIER, M.; GOTTSCHALK, J.; SCHUSSER, G. F.; HOPPEN, H. O.; UNGEMACH, F. R. Effects of dermal dexamethasone application on ACTH and both basal and ACTH-stimulated cortisol concentration in normal horses. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 32, p. 379-387, 2009.
- ALLCOCK, G. H.; ALLEGRA, M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 123, p. 62-67, 2001.
- ALMAWI, W. Y.; MELEMEDJIAN, O. K. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 28, n.2, p.69-78, 2002.
- ANDERSON, B.H.; WATSON, D.L.; COLDITZ, I.G. The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. **Vet. Res. Commun.**, v. 23, p. 399-413, 1999.
- ANGULO, I.; DE LAS HERAS, F. G.; GARCÍA-BUSTOS, J. F.; GARGALLO, D.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications for T-cell responses in immunosuppressed mice. **Blood**, v. 95, p. 212-220, 2000.
- ARBONÉS, M. L.; ORD, D. C.; LEY, K.; RATECH, H.; MAYNARD-CURRY, C.; OTTEN, G.; CAPON, D. J.; TEDDER, T. F. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. **Immunity**, v. 1, p. 247–260, 1994.
- ARUR, S.; UCHE, U. E.; REZAUL, K.; FONG, M.; SCRANTON, V.; COWAN, A. E.; MOHLER, W.; HAN, DK. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev. Cell.**, v. 4, p. 587-598, 2003.
- ATHENS, J. W.; HAAB, O. P.; RAAB, S. O.; MAUER, A. M.; ASHENBRUCKER, H.; CARTWRIGHT, G. E.; WINTROBE, M. M. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. **J. Clin. Invest.**, v. 40, p. 989-995, 1961.
- ATHENS, J. W. Blood: leukocytes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 25, 195–212, 1963.
- BACHELERIE, F. CXCL12/CXCR4-axis dysfunctions: Markers of the rare immunodeficiency disorder WHIM syndrome. **Dis. Markers**, v. 29, p. 189-198, 2010.
- BALABANIAN, K.; LAGANE, B.; INFANTINO, S.; CHOW, K.Y.; HARRIAGUE, J.; MOEPPS, B.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; THELEN, M.; BACHELERIE, F. The

chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 35760-35766, 2005.

BEYRAU, M.; BODKIN, J. V.; NOURSHARGH, S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. **Open Biol.**, v. 2, p. 120134, 2012.

BLACKWELL, G.J.; CARNUCCIO, R.; DI ROSA, M.; FLOWER, R.J.; PARENTE, L.; PERSICO, P. Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. **Nature**, v. 287, p. 147-149, 1980.

BLACKWELL, S.; CRAWFORD, J. Colony-stimulating factors: clinical applications. **Pharmacotherapy**, v. 12, p. 20S-31S, 1992.

BUCKLEY, C. D.; ROSS, E. A.; MCGETTRICK, H.M.; OSBORNE, C.E.; HAWORTH, O.; SCHMUTZ, C.; STONE, P. C.; SALMON, M.; MATHARU, N. M.; VOHRA, R. K.; NASH, G. B.; RAINGER, G. E. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, p. 303-311, 2006.

BUCKINGHAM, J. C. Fifteenth Gaddum Memorial Lecture December 1994. Stress and the neuroendocrine-immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 1-19, 1996.

BUCKINGHAM, J.C.; SOLITO, E.; JOHN, C.; TIERNEY, T.; TAYLOR, A.; FLOWER, R.; CHRISTIAN, H.; MORRIS, J. Annexin 1: a paracrine/juxtacrine mediator of glucocorticoid action in the neuroendocrine system. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 21, p. 217-221, 2003.

BUCKINGHAM, J. C.; JOHN, C. D.; SOLITO, E.; TIERNEY, T.; FLOWER, R. J.; CHRISTIAN, H.; MORRIS, J. Annexin 1, glucocorticoids, and the neuroendocrine-immune interface. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1088, p. 396-409, 2006.

BUGL, S.; WIRTHS, S.; MÜLLER, M. R.; RADSAK, M. P.; KOPP, H. G. Current insights into neutrophil homeostasis. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1266, p. 171-178, 2012.

BURDON, P. C.; MARTIN, C.; RANKIN, S. M. The CXC chemokine MIP-2 stimulates neutrophil mobilization from the rat bone marrow in a CD49d-dependent manner. **Blood**, v. 105, p. 2543-2548, 2005.

BURDON, P. C.; MARTIN, C.; RANKIN, S. M. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. **Br. J. Haematol.**, v. 142, p. 100-108, 2008.

BURNS, J.M.; SUMMERS, B.C.; WANG, Y.; MELIKIAN, A.; BERAHOVICH, R.; MIAO, Z.; PENFOLD, M.E.; SUNSHINE, M.J.; LITTMAN, D.R.; KUO, C.J.; WEI, K.; MCMMASTER, B.E.; WRIGHT, K.; HOWARD, M.C.; SCHALL, T.J. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2201-2213, 2006.

BURTON, J.L.; KEHRLI, M.E. JR.; KAPIL, S.; HORST, R.L. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. **J. Leukoc. Biol.**, v. 57, p. 317-325, 1995.

BUTTS, C. L.; JONES, Y. L.; LIM, J. K.; SALTER, C. E.; BELYAVSKAYA, E.; STERNBERG E. M. Tissue expression of steroid hormone receptors is associated with differential immune responsiveness. **Brain Behav. Immun.**, v. 25, p. 1000-1007, 2011.

CALLERA, G. E.; HE, Y.; YOGI, A.; MONTEZANO, A. C.; PARAVICINI, T.; YAO, G.; TOUYZ, R. M. Regulation of the novel Mg²⁺ transporter transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) cation channel by bradykinin in vascular smooth muscle cells. **J. Hypertens.**, v. 27, p. 155-166, 2009.

CAMPBELL, F.R. Ultrastructural studies of transmural migration of blood cells in the bone marrow of rats, mice and guinea pigs. **Am. J. Anat.**, v. 13, p. 521-535, 1972.

CAVALCANTI, D. M. H.; LOTUFO, C.M.; BORELLI, P.; TAVASSI, A.M.; PEREIRA, A. L.; MARKUS, R.P.; FARSKY, S. H. P. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 249, p. 32-39, 2006.

CAVALCANTI, D. M. H.; LOTUFO, C. M.; BORELLI, P.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P.; FARSKY, S. H. P. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. **Br. J.Pharmacol.**, v. 152, p. 1291-1300, 2007.

CHATNOVA, T.; SCHAEFFER, M.; HAN, S.J.; VAN DOOREN, G.G.; NOLLMANN, M.; HERZMARK, P.; CHAN, S.W.; SATIJA, H.; CAMFIELD, K.; AARON, H.; STRIEPEN, B.; ROBEY, E.A. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. **Immunity**, v. 29, p. 487-496, 2008.

CHATTERJEE, B. E.; YONA, S.; ROSIGNOLI, G.; YOUNG, R. E.; NOURSHARGH, S.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration in vivo and increased responsiveness in vitro. **J. Leuko. Biol.**, v. 78, p. 639-646, 2005.

CHIANG, N.; SERHAN, C. N. Cell-cell interaction in the transcellular biosynthesis of novel omega-3-derived lipid mediators. **Methods Mol. Biol.**, v. 341, p. 227-250, 2006.

CIRINO, G.; PEERS, S.H.; FLOWER, R.J.; BROWNING, J.L.; PEPINSKY, R.B. Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 3428-3432, 1989.

CRUMPTON, M.J.; DEDMAN, J.R. Protein terminology tangle. **Nature**, v. 345, p.212, 1990.

COLOTTA, F.; RE, F.; POLENTARUTTI, N.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, v. 80, p. 2012-2020, 1992.

CROXTALL, J. D.; CHOUDHURY, Q.; FLOWER, R. J. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br. J. Pharmacol.*, v. 130, p. 289-98, 2000.

CUNHA, F. Q.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 182, p. 1155-1159, 1992.

CURNOW, S.J.; WLOKA, K.; FAINT, J.M.; AMFT, N.; CHEUNG, C.M.; SAVANT, V.; LORD, J.; AKBAR, A.N.; BUCKLEY, C.D.; MURRAY, P.I.; SALMON, M. Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J. Immunol.*, v. 172, p. 7154-7161, 2004.

CURNOW, S. J.; MURRAY, P. I. Inflammatory mediators of uveitis: cytokines and chemokines. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, v. 17, p.532-537, 2006.

D'ACQUISTO, F.; MERGHANI, A.; LECONA, E.; ROSIGNOLI, G.; RAZA, K.; BUCKLEY, C.D.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood.*, v. 109, p. 1095-1102, 2007a.

D'ACQUISTO, F.; PASCHALIDIS, N.; SAMPAIO, A.L.; MERGHANI, A.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells. *Eur. J. Immunol.*, v. 37, p. 3131-3142, 2007b.

D'ACUNTO CW, GBELCOVA H, FESTA M, RUM T. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. *Cell. Signal*, Oct 5, *In press*, 2013.

DALE, D.C.; LILES, W.C.; LLEWELLYN, C.; RODGER, E.; PRICE, T.H. Neutrophil transfusions: kinetics and functions of neutrophils mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone. *Transfusion*, v. 38, p. 713-721, 1998.

DALLI, J.; JONES, C. P.; CAVALCANTI, D. M.; FARSKY, S. H.; PERRETTI, M.; RANKIN, S. M. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J.*, v. 26, p. 387-396, 2012a.

DALLI, J.; MONTERO-MELENDZ, T.; MCARTHUR, S.; PERRETTI, M. Annexin A1 N-terminal derived Peptide ac2-26 exerts chemokinetic effects on human neutrophils. *Front Pharmacol.*, v. 3, p.28, 2012b.

DALLI, J.; CONSALVO, A. P.; RAY, V.; DI FILIPPO, C.; D'AMICO, M.; MEHTA, N.; PERRETTI, M. Proresolving and tissue-protective actions of annexin A1-based cleavage-resistant peptides are mediated by formyl peptide receptor 2/lipoxin A4 receptor. *J. Immunol.*, v. 190, p. 6478-6487, 2013.

DAMAZO, A. S.; YONA, S.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J. Immunol.*, v. 176, p.4410-4418, 2006.

D'AMICO, M.; DI FILIPPO, C.; LA, M.; SOLITO, E.; MCLEAN, P. G.; FLOWER, R. J.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Lipocortin 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by affecting local leukocyte recruitment. **FASEB J.**, v. 14, p. 1867-1869, 2000.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 1041-1048, 1993.

DANCEY, J. T.; DEUBELBEISS, K. A.; HARKER, L. A.; FINCH, C. A. Neutrophil kinetics in man. **J. Clin. Invest.**, v. 58, p. 705-715, 1976.

DAVIES, E.; OMER, S.; BUCKINGHAM, J.C.; MORRIS, J.F.; CHRISTIAN, H.C. Expression and externalization of annexin 1 in the adrenal gland: structure and function of the adrenal gland in annexin 1-null mutant mice. **Endocrinology**, v. 148, p. 1030-1038, 2007.

DAY, R.B.; LINK, D.C. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 69, p. 1415-1423, 2012.

DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain Behav. Immun.**, v. 24, p. 1035-1042, 2010.

DE CASTRO, M.; ELLIOT, S.; KINO, T.; BAMBERGER, C.; KARL, M.; WEBSTER, E.; CHROUSOS, G. P. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. **Mol. Med.**, v. 2, p. 597-607, 1996.

DE COUPADE, C.; SOLITO, E.; LEVINE, J.D. Dexamethasone enhances interaction of endogenous annexin 1 with L-selectin and triggers shedding of L-selectin in the monocytic cell line U-937. **Br. J. Pharmacol.**, v.140, p. 133-145, 2003.

DE COUPADE, C.; GILLET, R.; BENNOUN, M.; BRIAND, P.; RUSSO-MARIE, F.; SOLITO, E. Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice. **Hepatology**, v. 31, p. 371-380, 2000.

DE SANTO, C.; ARSCOTT, R.; BOOTH, S.; KARYDIS, I.; JONES, M.; ASHER, R.; SALIO, M.; MIDDLETON, M.; CERUNDOLO, V. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. **Nat. Immunol.**, v. 11, p. 1039-1046, 2010.

DENNY, M. F.; YALAVARTHI, S.; ZHAO, W.; THACKER, S. G.; ANDERSON, M.; SANDY, A. R.; MCCUNE, W. J.; KAPLAN, M. J. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. **J. Immunol.**, v. 184, p. 3284-3297, 2010.

DI ROSA, M.; FLOWER, R. J.; HIRATA, F.; PARENTE, L.; RUSSO-MARIE, F. Anti-phospholipase proteins. **Prostaglandins**, v. 28, p. 441–442, 1984.

DIMASI, D.; SUN, W. Y.; BONDER, C. S. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. **Int. Immunopharmacol.**, v. 17, p. 1167-1675, 2013.

DIMITROFF, C. J.; LEE, J.Y.; SCHOR, K. S.; SANDMAIER, B. M.; SACKSTEIN, R. Differential L-selectin binding activities of human hematopoietic cell L-selectin ligands, HCELL and PSGL-1. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 47623-47631, 2001.

DOMANSKA, U.M.; KRUIZINGA, R.C.; NAGENGAST, W.B.; TIMMER-BOSSCHA, H.; HULS, G.; DE VRIES, E.G.; WALENKAMP, A.M. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. **Eur. J. Cancer**, v. 49, p. 219-230, 2013.

DOROVKOV, M. V.; RYAZANOV, A. G. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 50643-50646, 2004.

DOROVKOV, M. V.; KOSTYUKOVA, A. S.; RYAZANOV, A. G. Phosphorylation of annexin A1 by TRPM7 kinase: a switch regulating the induction of an α -helix. **Biochemistry**, v. 50, p. 2187-2193, 2011.

DRAPER, N.; STEWART, P. M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. **J. Endocrinol.**, v. 186, p. 251-271, 2005.

DUCHENE, J.; LECOMTE, F.; AHMED, S.; CAYLA, C.; PESQUERO, J.; BADER, M.; PERRETTI, M., AHLUWALIA, A. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin b1 receptor and the chemokine CXCL51. **J. Immunol.**, v. 179, p.4849-4856, 2007.

DUFTON, N.; PERRETTI, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacol. Ther.**, v. 127, p. 175-188, 2010.

DUFTON, N.; HANNON, R.; BRANCALEONE, V.; DALLI, J.; PATEL, H. B.; GRAY, M.; D'ACQUISTO, F.; BUCKINGHAM, J. C.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. **J. Immunol.**, v. 184, p. 2611-2619, 2010.

EASH, K. J.; MEANS, J. M.; WHITE, D. W.; LINK, D. C. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. **Blood.**, v.113, p. 4711-4719, 2009.

ETZIONI, A. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, p. 481–486, 2009.

EVA, C.; SPRENGEL, R. A novel putative G protein-coupled receptor highly expressed in lung and testis. **DNA Cell Biol.**, v. 12, p.393–399,1993.

FADOK, V. A.; MCDONALD, P. P.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 26, p. 653–656, 1998.

FARKAS, G.; BUDAY, L.; CSERMELY, P.; FARAGÓ, A. Lipocortin I is not accessible for protein kinase C bound to the cytoplasmic surface of the plasma membrane in streptolysin-O-permeabilized pig granulocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1220, p. 315-322, 1994.

FARSKY, S. H. P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted endogenous glucocorticoids regulate leukocyte–endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. **J. Leukoc. Biol.**, v. 57, p. 379–386, 1995.

FERLAZZO, V.; D'AGOSTINO, P.; MILANO, S.; CARUSO, R.; FEO, S.; CILLARI, E.; PARENTE, L. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 1363-1369, 2003.

FILEP, J. G.; DELALANDRE, A.; PAYETTE, Y.; FOLDES-FILEP, E. Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. **Circulation**, v. 96, p. 295–301, 1997.

FINK, P.J.; HENDRICKS, D.W. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 544-549, 2011.

FLOWER, R.; GRYGLEWSKI, R.; HERBACZYŃSKA-CEDRO, K.; VANE, J.R. Effects of anti-inflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis. **Nat. New Biol.**, v. 238, p. 104-106, 1972.

FLOWER, R. J.; PARENTE, L.; PERSICO, P.; SALMON, J.A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and shamoperated rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 87, p. 57–62, 1986.

FULLER, P. J.; VERITY, K. Somatostatin gene expression in the thymus gland. **J. Immunol.**, v. 143, p. 1015-1017, 1989.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunol.**, v. 125, p. 281-288, 2008b.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. **FASEB J.**, v. 22, p. 3111-3119, 2008a.

GALLIN, J. I. Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? **Blood**, v. 63, p. 977-983, 1984.

GASTARDELO, T. S.; DAMAZO, A. S.; DALLI, J.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. **Am. J. Pathol.**, v. 174, p. 177-183, 2009.

GAVINS, F. N.; YONA, S.; KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, p. 4140-4147, 2003.

GAVINS, F. N.; HUGHES, E. L.; BUSS, N. A.; HOLLOWAY, P. M.; GETTING, S. J.; BUCKINGHAM JC. Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. **FASEB J.**, v. 26, 4977-4989, 2012.

GENEDANI, S.; FILAFERRO, M.; CARONE, C.; OSPAN, R.; BUCCI, L.; CEVENINI, E.; FRANCESCHI, C.; MONTI, D. Influence of f-MLP, ACTH(1-24) and CRH on in vitro chemotaxis of monocytes from centenarians. **Neuroimmunomodulation.**, v. 15, p. 285-289, 2008.

GENG, S.; MATSUSHIMA, H.; OKAMOTO, T.; YAO, Y.; LU, R.; PAGE, K.; BLUMENTHAL, R.M.; WARD, N.L.; MIYAZAKI, T.; TAKASHIMA, A. Emergence, origin, and function of neutrophil-dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. **Blood.**, v. 121, p. 1690-1700, 2013.

GERKE, V.; CREUTZ, C.E.; MOSS, S.E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 6, p. 449-461, 2005.

GETTING, S. J.; GIBBS, L.; CLARK, A. J.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. **J. Immunol.**, v. 162, p. 7446-7453, 1999.

GETTING, S. J.; PERRETTI, M. Arthritic diseases: melanocortin type 3 receptor agonists as potential therapeutics. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 2, p. 1064-1069, 2001.

GETTING, S. J.; CHRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 46, p. 2765-2775, 2002.

GHOSH, M.C.; BAATAR, D.; COLLINS, G.; CARTER, A.; INDIG, F.; BIRAGYN, A.; TAUB, D.D. Dexamethasone augments CXCR4-mediated signaling in resting human T cells via the activation of the Src kinase Lck. **Blood.**, v. 113, p. 575-584, 2009.

GIROL, A. P.; MIMURA, K. K.; DREWES, C. C.; BOLONHEIS, S. M.; SOLITO, E.; FARSKY, S. H.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J. Immunol.**, v. 190, p. 5689-5701, 2013.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. S9-17, 2007.

GORDY, C.; PUA, H.; SEMPOWSKI, G.D.; HE Y.W. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. **Blood**, v. 117, p. 618-629, 2011.

GOOZ, M. ADAM-17: the enzyme that does it all. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 45, p. 146-169, 2010.

GREGORY, J. L.; HALL, P.; LEECH, M.; MORAND, E. F.; HICKEY, M. J. Independent roles of Macrophage Migration Inhibitory Factor and endogenous, but not exogenous glucocorticoids in regulating leukocyte trafficking. **Microcirc.**, v. 16, p. 735-748, 2009.

GROENEWEG, F. L.; KARST, H.; DE KLOET, E. R.; JOËLS, M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 350, p. 299-309, 2012.

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. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. **FASEB J.**, v. 17, p. 253-255, 2003.

HARRIS, J. G.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Endogenous corticosteroids mediate the neutrophilia caused by platelet-activating factor in the mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 283, p. 9-18, 1995.

HAYHOE, R. P. G., KAMAL, A. M.; SOLITO, E.; FLOWER, R. J.; COOPER, D.; PERRETTI, M. Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. **Blood**, v. 107, p. 2123-2130, 2006.

HENDRIX, C. W.; COLLIER, A. C.; LEDERMAN, M. M.; SCHOLS, D.; POLLARD, R. B.; BROWN, S.; JACKSON, J. B.; COOMBS, R. W.; GLESBY, M. J.; FLEXNER, C. W.; BRIDGER, G. J.; BADEL, K.; MACFARLAND, R. T.; HENSON, G. W.; CALANDRA, G. AMD3100 HIV Study Group. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.n**, v. 37, p. 1253-1262, 2004.

HERTER, J.; ZARBOCK, A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. **J. Immunol.**, v. 190, p. 4451-4457, 2013.

HIRSCHELMANN, R.; BÖHM, V.; FUNKE, T. Hydrogen peroxide production ex vivo by peritonitis exudate leukocytes of rats and influence of dexamethasone and a glucocorticoid antagonist. **Agents Actions.**, v. 23, p. 101-102, 1988.

JAILLON, S.; GALDIERO, M.R.; DEL PRETE, D.; CASSATELLA, M.A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. **Semin. Immunopathol.**, Apr 4. *In press*, 2013.

JOHN, C. D.; CHRISTIAN, H. C.; MORRIS, J. F.; FLOWER, R. J.; SOLITO, E.; BUCKINGHAM, J. C. Annexin 1 and the regulation of endocrine function. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 15, p. 103-109, 2004.

JOHN, C. D.; SAHNI, V.; MEHET, D.; MORRIS, J. F.; CHRISTIAN, H. C.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J.; SOLITO, E.; BUCKINGHAM, J. C. Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. **FASEB J.**, v. 21, p. 1037-1046, 2007.

JOHN, C. D.; GAVINS, F. N.; BUSS, N. A.; COVER, P. O.; BUCKINGHAM, J. C. Annexin A1 and the formyl peptide receptor family: neuroendocrine and metabolic aspects. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 8, p. 765-776, 2008.

KASSIRER, M.; ZELTSER, D.; GLUZMAN, B.; LEIBOVITZ, E.; GOLDBERG, Y.; ROTH, A.; KEREN, G.; ROTSTEIN, R.; SHAPIRA, I.; ARBER, N.; BERLINER, A. S. The appearance of L-selectin (low) polymorphonuclear leukocytes in the circulating pool of peripheral blood during myocardial infarction correlates with neutrophilia and with the size of the infarct. **Clin. Cardiol.**, v. 22, p. 721-726, 1999.

KHAU, T.; LANGENBACH, S.Y.; SCHULIGA, M.; HARRIS, T.; JOHNSTONE, C.N.; ANDERSON, R.L.; STEWART, A.G. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2. **FASEB J.**, v. 25, p. 483-496, 2011.

KIM, D.; HAYNES, C. L. Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of hemoattractants. **Anal. Chem.**, v. 84, p. 6070-6078, 2012.

KIRWAN, J. R. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, 142-146, 1995.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 159-175, 2013.

KRSTIC, A.; MOJSILOVIC, S.; JOVCIC, G.; BUGARSKI, D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. **Immunol. Res.**, v. 52, p. 34-41, 2012.

KUCIA, M.; JANKOWSKI, K.; RECA, R.; WYSOCZYNSKI, M.; BANDURA, L.; ALLENDORF, D. J.; ZHANG, J.; RATAJCZAK J.; RATAJCZAK, M. Z. CXCR-4–SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. **J. Mol. Histol.**, v. 35, p. 233-245, 2004.

LA, M.; D'AMICO, M.; BANDIERA, S.; DI FILIPPO, C.; OLIANI, S. M.; GAVINS, F. N.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. **FASEB J.**, v. 15, p. 2247-2256, 2001.

LAAN, M.; CUI, Z. H.; HOSHINO, H.; LÖTVALL, J.; SJÖSTRAND, M.; GRUENERT, D. C.; SKOOGH, B. E.; LINDÉN, A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. **J. Immunol.**, v. 162, p. 2347–2352, 1999.

LAPIDOT, T.; KOLLET, O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR-4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice. **Leukemia**, v. 16, p. 1992–2003, 2002.

LARANGEIRA, A. P.; SILVA, A. R.; GOMES, R. N.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.. Mechanisms of allergen- and LPS-

induced bone marrow eosinophil mobilization and eosinophil accumulation into the pleural cavity: a role for CD11b/CD18 complex. **Inflamm. Res.**, v. 50, p. 309–316, 2001.

LAUE, L.; KAWAI, S.; BRANDON, D.D.; BRIGHTWELL, D.; BARNES, K.; KNAZEK, R.A.; LORIAUX, D.L.; CHROUSOS, G.P. Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: enhancement of the inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. **J. Steroid. Biochem.**, v. 29, p. 591-598, 1988.

LAZAR, G. JR.; LAZAR, G.; AGARWAL, M. K. Modification of septic shock in mice by the antiglucocorticoid RU 38486. **Circ Shock.**, v. 36, p. 180-184, 1992.

LAZZARINI, R.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 32, p. 402-409, 2010.

LEE, H.N.; SURH, Y.J. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. **Biochem. Pharmacol.**, v. 84, p. 1340-1350, 2012.

LEECH, M.; HUTCHINSON, P.; HOLDSWORTH, S. R.; MORAND, E. F. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil migration and synovial P-selectin but not neutrophil phagocytic or oxidative function in experimental arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 112, p. 383-388, 1998.

LEECH, M.; HUANG, X. R.; MORAND, E. F.; HOLDSWORTH, S. R. Endogenous glucocorticoids modulate experimental anti glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 119, p. 161–168, 2000.

LEY, K.; SMITH, E.; STARK, M.A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. **Immunol. Res.**, v. 34, p. 229-242, 2006.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p.678–689, 2007.

LI, J. L.; NG, L. G. Peeking into the secret life of neutrophils. **Immunol. Res.**, v. 53, p. 168-181, 2012.

LIANG-SUO, J.; GOMEZ-FLORES, R.; WEBER, R.J. Immunosuppression induced by central action of morphine is not blocked by mifepristone (RU 486). **Life Sci.**, v. 71, p. 2595-2602, 2002.

LIBERT, F.; PARMENTIER, M.; LEFORT, A.; DINSART, C.; VAN SANDE, J.; MAENHAUT, C.; SIMONS, M.J.; DUMONT, J.E.; VASSART, G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. **Science**, v. 244, p. 569-572, 1989.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; DA SILVA, Z.L.; BORELLI, P.; TAVARES DE LIMA, W. Regulation of allergic lung inflammation in rats:

interaction between estradiol and corticosterone. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 20-27, 2004.

LILES, W. C.; HUANG, J. E.; LLEWELLYN, C.; SENGUPTA, D.; PRICE, T. H.; DALE, D. C. A comparative trial of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone, separately and in combination, for the mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. **Transfusion**, v. 37, p. 182-187, 1997.

LIM, S.; JATAKANON, A.; GORDON, D.; MACDONALD, C.; CHUNG, K.F.; BARNES, P.J. Comparison of high dose inhaled steroids, low dose inhaled steroids plus low dose theophylline, and low dose inhaled steroids alone in chronic asthma in general practice. **Thorax**, v. 55, p. 837-841, 2000.

LIM, L.H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J.** v. 21, p. 968-975, 2007.

LONG, F.; WANG, Y. X.; LIU, L.; ZHOU, J.; CUI, R. Y.; JIANG, C. L. Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. **Steroids**, v. 70, p. 55-61, 2005.

LÖWENBERG, M.; VERHAAR, A. P.; VAN DEN BRINK, G. R.; HOMMES, D. W. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for t-cell immunosuppression. **Trends Mol. Med.**, v. 13, p. 158-163, 2007.

LOXLEY, H. D.; COWELL, A. M.; FLOWER, R. J.; BUCKINGHAM, J. C. Modulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses to cytokines in the rat by lipocortin 1 and glucocorticoids: a role for lipocortin 1 in the feedback inhibition of CRF-41 release? **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 801-814, 1993.

LU, N. Z.; CIDLOWSKI, J. A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1024, p. 102-123, 2004.

LUI, L.; WANG, Y. X.; ZHOU, J.; LONG, F.; SUN, H. W.; LIU, Y. Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation. **Inflamm. Res.**, v. 54, p. 37-41, 2005.

LUND-JOHANSEN, F.; TERSTAPPEN, L. W. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 54, p. 47-55, 1993.

MA, Q.; JONES, D.; BORGHESEANI, P. R.; SEGAL, R. A.; NAGASAWA, T.; KISHIMOTO, T.; BRONSON, R. T.; SPRINGER, T. A. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 95, p. 9448-9453, 1998.

MAKRYGIANNAKIS, D.; KLINT, E.; CATRINA, S. B.; BOTUSAN, I. R.; KLARESKOG, E.; KLARESKOG, L.; ULFGREN, A. K.; CATRINA, A. I. Intraarticular corticosteroids decrease synovial RANKL expression in inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 54, p. 1463-1472, 2006.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J. Pathol.**, v. 229, p. 176-185, 2013.

MARTIN, C.; BURDON, P. C.E.; BRIDGER, G.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; WILLIAMS, T. J.; RANKIN, S. Chemokines acting via CXCR-2 and CXCR-4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. **Immunity**, v. 19, p. 583–593, 2003.

MARTIN, C.; BRIDGER, G.; RANKIN, S. Structural analogues of AMD3100 mobilize haematopoietic progenitor cells from bone marrow in vivo according to their ability to inhibit CXCL12 binding to CXCR-4 in vitro. **Br. J. Hemat.**, v. 134, p. 326–329, 2006.

MATSUSHIMA, H.; GENG, S.; LU, R.; OKAMOTO, T.; YAO, Y.; MAYUZUMI, N.; KOTOL, P.F.; CHOJNACKI, B.J.; MIYAZAKI, T.; GALLO, R.L.; TAKASHIMA, A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. **Blood**, v. 121, p. 1677-1689, 2013.

McEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol. Rev.**, v.87, p. 873-904, 2007.

MIZOBE, K.; KISHIHARA, K.; EZZ-DIN EL-NAGGAR, R.; MADKOUR, G. A.; KUBO, C.; NOMOTO, K. Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. **J. Neuroimmunol.**, v. 73, p. 81-89, 1997.

MOEPPS, B.; BRAUN, M.; KNOPFLE, K.; DILLINGER, K.; KNOCHEL, W.; GIERSCHIK, P. Characterization of a *Xenopus laevis* CXC chemokine receptor 4: Implications for hematopoietic cell development in the vertebrate embryo. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 2924–2934, 2000.

MOGUILLEWSKY, M.; PHILIBERT, D. RU 38486: potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic glucocorticoid receptor followed by an impaired activation. **J. Steroid. Biochem.**, v. 20, n. 1, p. 271-276, 1984.

MÖHLE, R.; DROST, A.C. G protein-coupled receptor crosstalk and signaling in hematopoietic stem and progenitor cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1266, p. 63-67, 2012.

MORAES, F. R.; BECHARA, G. H.; MORAES, J. R. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 47–53, 1987.

MORAND, E. F.; HUTCHINSON, P.; HARGREAVES, A.; GOULDING, N. J.; BOYCE, N. W.; HOLDSWORTH, S. R. DETECTION OF INTRACELLULAR LIPOCORTIN 1 IN HUMAN LEUKOCYTE SUBSETS. **CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL.**, V. 76, P. 195-202, 1995.

MORRIS, J.F.; OMER, S.; DAVIES, E.; WANG, E.; JOHN, C.; AFZAL, T.; WAIN, S.; BUCKINGHAM, J.C.; FLOWER, R.J.; CHRISTIAN, H.C. Lack of annexin 1 results in an increase in corticotroph number in male but not female mice. **J. Neuroendocrinol.**, v. 18, p. 835-846, 2006.

MOUSTAKI, A.; ARGYROPOULOS, K.V.; BAXEVANIS, C.N.; PAPAMICHAIL, M.; PEREZ, S.A. Effect of the simultaneous administration of glucocorticoids and IL-15 on human NK cell phenotype, proliferation and function. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 60, p. 1683-1695, 2011.

MULLA, A.; LEROUX, C.; SOLITO, E.; BUCKINGHAM, J. C. Correlation between the antiinflammatory protein annexin 1 (lipocortin 1) and serum cortisol in subjects with normal and dysregulated adrenal function. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 557-562, 2005.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol.** v. 24, p. 327–334, 2003.

MIYAMOTO, M.; EMOTO, M.; EMOTO, Y.; BRINKMANN, V.; YOSHIZAWA, I.; SEILER, P.; AICHELE, P.; KITA, E.; KAUFMANN, S. H. Neutrophilia in LFA-1-deficient mice confers resistance to listeriosis: possible contribution of granulocyte-colony-stimulating factor and IL-17. **J. Immunol.**, v. 170, p. 5228-5234, 2003.

NAKAGAWA, M.; BONDY, G. P.; WAISMAN, D.; MINSHALL, D.; HOGG, J. C.; VAN EEDEN, S. F. The effect of glucocorticoids on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 93, p. 2730–2737, 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 173–182, 2006.

NIXON, M.; ANDREW, R.; CHAPMAN, K. E. It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. **Steroids**, v. 78, p. 59-68, 2013.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends Immunol.**, v. 26, p. 157–165. 2005.

OAKLEY, R. H.; JEWELL, C. M.; YUDT, M. R.; BOFETIADO, D. M.; CIDLOWSKI, J. A. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 27857–27866, 1999.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Mol. Med.**, v. 5, p. 661-174, 2013.

OTTEN, M. A.; RUDOLPH, E.; DECHANT, M.; TUK, C. W.; REIJMERS, R. M.; BEELEN, R. H.; VAN DE WINKEL, J. G.; VAN EGMOND, M. Immature neutrophils

mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. **J. Immunol.**, v. 174, p. 5472-5480, 2005.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 537–55, 1999.

PATEL, D. M.; AHMAD, S. F.; WEISS, D. G.; GERKE, V.; KUZNETSOV, S. A. Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. **J. Cell. Sci.**, v. 124, p. 578-588, 2011.

PARENTE, L.; SOLITO, E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. **Inflamm. Res.**, v. 53, p. 125-132, 2004.

PEERS, S.H.; MOON, D.; FLOWER, R.J. Reversal of the anti-inflammatory effects of dexamethasone by the glucocorticoid antagonist RU 38486. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 556-557, 1988.

PEERS, S.H.; SMILLIE, F.; ELDERFIELD, A.J.; FLOWER, R.J. Glucocorticoid-and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leucocytes in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, p. 66-72, 1993.

PEREIRA, S.; ZHOU, M.; MÓCSAI, A.; LOWELL, C. Resting murine neutrophils express functional alpha 4 integrins that signal through Src family kinases. **J. Immunol.**, v. 166, p. 4115-4123, 2001.

PEPINSKY, R. B.; SINCLAIR, L. K. Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin. **Nature**, v. 321, 81-84, 1986.

PEPINSKY, R. B.; SINCLAIR, L. K. BROWNING, J. L.; MATTALIANO, R. J.; SMART, J. E.; CHOW, E. P.; FALBEL, T.; RIBOLINI, A.; GARWIN, J. L.; WALLNER, B. P. Purification and partial sequence analysis of a 37-kDa protein that inhibits phospholipase A2 activity from rat peritoneal exudates. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 4239-4246, 1986.

PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. **J. Immunol.**, v. 150, p. 992-999, 1993.

PERRETTI, M.; CROXTALL, J.D.; WHELLER, S.K.; GOULDING, N.J.; HANNON, R.; FLOWER, R.J. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. **Nat. Med.**, v. 2, p. 1259-1262, 1996.

PERRETTI, M.; CHRISTIAN, H.; WHELLER, S. K.; AIELLO, I.; MUGRIDGE, K. G.; MORRIS, J. F.; FLOWER, R. J.; GOULDING, N. J. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell. Biol. Int.**, v. 24, p. 163-174, 2000.

PERRETTI, M.; GAVINS, F. N. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. **News Physiol. Sci.**, v. 18, p. 60-64, 2003.

PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, p. 25-29, 2004.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 62-70, 2009.

PETTY, J. M.; LENOX, C. C., WEISS, D. J.; POYNTER, M. E.; SURATT, B.T. Crosstalk between CXCR-4/Stromal Derived Factor-1 and VLA-4/VCAM-1 Pathways Regulates Neutrophil Retention in the Bone Marrow. **J. Immunol.**, v. 182, p. 604 - 612, 2009.

PIEMONTI, L.; MONTI, P.; ALLAVENA, P.; SIRONI, M.; SOLDINI, L.; LEONE, B.E.; SOCCI, C.; DI CARLO, V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. **J. Immunol.**, v. 162, p. 6473-6481, 1999.

PILLAY, J.; DEN BRABER, I.; VRISEKOO, N.; KWAST, L. M.; DE BOER, R. J.; BORGHANS, J. A.; TESSELAAR, K.; KOENDERMAN, L. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v. 116, p. 625-627, 2010a.

PILLAY, J.; RAMAKERS, B. P.; KAMP, V. M.; LOI, A. L.; LAM, S. W.; HIETBRINK, F.; LEENEN, L. P.; TOOL, A. T.; PICKKERS, P.; KOENDERMAN, L. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. **J. Leukoc Biol.**, v. 88, p. 211-220, 2010b.

PILLAY, J.; KAMP, V. M.; VAN HOFFEN, E.; VISSER, T.; TAK, T.; LAMMERS, J. W.; ULFMAN, L. H.; LEENEN, L. P.; PICKKERS, P.; KOENDERMAN, L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. **J. Clin. Invest.**, v. 122, p. 327-336, 2012.

PITCHFORD, S. C.; FURZE, R. C.; JONES, C. P.; WENGER, A. M.; RANKIN, S. M. Differential Mobilization of Subsets of Progenitor Cells from the Bone Marrow. **Cell Stem Cell**, v. 4, p. 62-72, 2009.

PITZALIS, C.; PIPITONE, N.; PERRETTI, M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 966, p. 108-118, 2002.

QIN, C.; BUXTON, K. D.; PEPE, S.; CAO, A. H.; VENARDOS, K.; LOVE, J. E.; KAYE, D. M.; YANG, Y. H.; MORAND, E. F.; RITCHIE, R. H. Reperfusion-induced myocardial dysfunction is prevented by endogenous annexin-A1 and its N-terminal-derived peptide Ac-ANX-A1(2-26). **Br. J. Pharmacol.**, v. 168, p. 238-252, 2013.

RAHMOUN, M.; FOUSSAT, A.; GROUX, H.; PÈNE, J.; YSSEL, H.; CHANEZ, P. Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 140, p. 139-149, 2006.

RATAJCZAK, M.Z.; KIM, C.H.; ABDEL-LATIF, A.; SCHNEIDER, G.; KUCIA, M.; MORRIS, A.J.; LAUGHLIN, M.J.; RATAJCZAK, J. A novel perspective on stem cell homing and mobilization: review on bioactive lipids as potent chemoattractants and

cationic peptides as underappreciated modulators of responsiveness to SDF-1 gradients. **Leukemia.**, v. 26, p. 63-72, 2012.

RATMAN, D.; VANDEN BERGHE, W.; DEJAGER, L.; LIBERT, C.; TAVERNIER, J.; BECK, I. M.; DE BOSSCHER, K. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 380, p. 41-54, 2013.

RAYNAL, P.; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1197, p. 63-93, 1994.

RECCHIUTI, A. Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, Mar 15, *In press*, 2013.

ROBINSON, S. D.; FRENETTE, P. S.; RAYBURN, H.; CUMMISKEY, M.; ULLMAN-CULLERE, M.; WAGNER, D. D.; HYNES, R. O. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 11452–11457, 1999.

ROGOWSKI, O.; SASSON, Y.; KASSIRER, M.; ZELTSER, D.; MAHARSHAK, N.; ARBER, N.; HALPERIN, P. SERROV, J.; SORKIN, P.; ELDOR, A.; BERLINER, S. Down-regulation of the CD62L antigen as a possible mechanism for neutrophilia during inflammation. **Br. J. Haematol.**, v. 101, 1998.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v.20, p.315-328,1947.

ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L.; HSU, W. H. Effects of ACTH administration on bovine polymorphonuclear leukocyte function and lymphocyte blastogenesis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 43, p. 412-416, 1982.

ROVAI, L. E.; HERSCHMAN, H. R.; SMITH, J. B. The murine neutrophil chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. **J. Leukoc. Biol.**, v. 64, p. 494–502, 1998.

SALAK-JOHNSON, J. L.; MCGLONE, J. J.; NORMAN, R. L. In vivo glucocorticoid effects on porcine natural killer cell activity and circulating leukocytes. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 584-592 1996.

SAKAI, D. D.; HELMS, S.; CARLSTEDT-DUKE, J.; GUSTAFSSON, J. A.; ROTTMAN, F. M.; YAMAMOTO, K. R. Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. **Genes Dev.**, v. 2, p. 1144-1154, 1988.

SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; SÁNCHEZ-MATEOS, P.; CABAÑAS, C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. **Trends Mol. Med.**, v. 19, p. 12-22, 2013.

SAVILL, J. S.; WYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M. J.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 865–875, 1989.

SAVILL, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Br. Med. Bull.**, v. 53, p. 491-508, 1997.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 965-975, 2002.

SCHÄCKE, H.; SCHOTTELIUS, A.; DÖCKE, W. D.; STREHLKE, P.; JAROCH, S.; SCHMEES, N.; REHWINKEL, H.; HENNEKES, H.; ASADULLAH, K. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 1, p. 227-232, 2004.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; GARBERS, C.; ROSE-JOHN, S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. **Trends Immunol.**, v. 32, p. 380-387, 2011.

SCHLAEPFER, D. D.; HAIGLER, H. T. Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 6931-6937, 1987.

SCHRAMM, R.; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflamm. Res.**, v. 53, p. 644-652, 2004.

SCHWEITZER, K. M.; DRAGER, A. M.; VAN DER VALK, P.; THIJESSEN, S. F.; ZEVENBARGEN, A.; THEIJSMEIJER, A. P.; VAN DER SCHOOT, C. E.; LANGENHUIJSEN, M. M. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. **Am. J. Pathol.**, v. 148, p.165–175, 1996.

SCOTT, L. M.; PRIESTLEY, G. V.; PAPAYANNOPOULOU, T. Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 9349–9360, 2003.

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. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J.**, v. 21, p.325-332, 2007.

SILVERMAN, M. N.; STERNBERG, E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann. NY Acad Sci.**, v. 1261, p. 55-63, 2012.

SIMMONS, P. J.; MASINOVSKY, B.; LONGENECKER, B. M.; BERENSON, R.; TOROK-STORB, B.; GALLATIN, W. M. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 80, p.388–395, 1992.

SMITH, L.K.; SHAH, R.R.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoids modulate microRNA expression and processing during lymphocyte apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 36698-36708, 2010.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research, New York: W. H. **Freeman Company**, p. 887, 1995.

SOLANA, R.; TARAZONA, R.; GAYOSO, I.; LESUR, O.; DUPUIS, G.; FULOP, T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. **Semin. Immunol.**, v. 24, p. 331-341, 2012.

SOLITO, E.; RAGUENES-NICOL, C.; DE COUPADE, C.; BISAGNI-FAURE, A.; RUSSO-MARIE, F. U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA2 activity. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, p. 1675-1683, 1998.

SOLITO, E.; KAMAL, A.; RUSSO-MARIE, F.; BUCKINGHAM, J.C.; MARULLO, S.; PERRETTI, M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. **FASEB J.**, v. 17, p. 1544-1546, 2003.

SOLITO, E.; CHRISTIAN, H. C.; FESTA, M.; MULLA, A.; TIERNEY, T.; FLOWER, R. J.; BUCKINGHAM, J. C. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB J.**, v. 20, p. 1498-1500, 2006.

SONG, I. H.; BUTTGEREIT, F. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 246, p. 142-16, 2006.

STAHN, C.; LÖWENBERG, M.; HOMMES, D.W.; BUTTGEREIT, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoids receptor agonists. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 275, n. 1-2, p. 71-78, 2007.

STARK, M. A.; HUO, Y.; BURCIN, T. L.; MORRIS, M. A.; OLSON, T. S.; LEY, K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 285-294, 2005.

STRAUSBAUGH, H. J.; ROSEN, S. D. A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from myeloid cells. **J. Immunol.**, v. 166, p. 6294-6300, 2001.

STREHL, C.; SPIES, C.M.; BUTTGEREIT, F. Pharmacodynamics of glucocorticoids. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 29, p. S13-8, 2011.

SUMMERS, C.; RANKIN, S.M.; CONDLIFFE, A.M.; SINGH, N.; PETERS, A.M.; CHILVERS, E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends Immunol.**, v. 31, p. 318-324, 2010.

SUNDD, P.; GUTIERREZ, E.; KOLTSOVA, E. K.; KUWANO, Y.; FUKUDA, S.; POSPIESZALSKA, M. K.; GROISMAN, A.; LEY, K. 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. **Nature**, v. 488, p. 399-403, 2012.

TANEJA, R.; SHARMA, A. P.; HALLETT, M. B.; FINDLAY, G. P.; MORRIS, M. R. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. **Shock**, v. 30, 618–622, 2008.

TARNOWSKI, M.; LIU, R.; WYSOCZYNSKI, M.; RATAJCZAK, J.; KUCIA, M.; RATAJCZAK, M.Z. CXCR7: a new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34(+) progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells. **Eur. J. Haematol.**, v. 85, p. 472-483, 2010.

TATENO, T.; IZUMIYAMA, H.; DOI, M.; YOSHIMOTO, T.; SHICHIRI, M.; INOSHITA, N.; OYAMA, K.; YAMADA, S.; HIRATA, Y. Differential gene expression in ACTH - secreting and non-functioning pituitary tumors. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 157, p. 717-724, 2007.

TAYLOR, A. D.; COWELL, A. M.; FLOWER, J.; BUCKINGHAM, J. C. Lipocortin 1 mediates an early inhibitory action of glucocorticoids on the secretion of ACTH by the rat anterior pituitary gland in vitro. **Neuroendocrinology**, v. 58, p. 430-439, 1993.

TAYLOR, A. D.; FLOWER, R. J.; BUCKINGHAM, J. C. Dexamethasone inhibits the release of TSH from the rat anterior pituitary gland in vitro by mechanisms dependent on de novo protein synthesis and lipocortin 1. **J. Endocrinol.**, v. 147, p. 533-544, 1995.

TEIXEIRA, R.A.; MIMURA, K.K.; ARAUJO, L.P.; GRECO, K.V.; OLIANI, S.M. The essential role of annexin A1 mimetic peptide in the skin allograft survival. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, 2013.

TJANDRA, K.; KUBES, P.; RIOUX, K.; SWAIN, M.G. Endogenous glucocorticoids inhibit neutrophil recruitment to inflammatory sites in cholestatic rats. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. G821-G825, 1996.

TORSTEINSDOTTIR, I.; ARVIDSON, N. G.; HALLGREN, R.; HAKANSSON, L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. **Scand. J. Immunol.**, v. 50, p. 433–439, 1999.

TRIPATHI, V.; VERMA, R.; DINDA, A.; MALHOTRA, N.; KAUR, J.; LUTHRA, K. Differential expression of RDC1/CXCR7 in the human placenta. **J. Clin. Immunol.**, v. 29, p. 379-386, 2009.

TROTTIER, M. D.; NEWSTED, M. M.; KING, L. E.; FRAKER, P. J. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 105, p. 2028-2033, 2008.

TSUDA, Y.; TAKAHASHI, H.; KOBAYASHI, M.; HANAFUSA, T.; HERNDON, D. N.; SUZUKI, F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Immunity**, v. 215-226, 2004.

URQUHART, P.; ROSIGNOLI, G.; COOPER, D.; MOTTERLINI, R.; PERRETTI, M. Carbon monoxide-releasing molecules modulate leukocyte-endothelial interactions under flow. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 321, p. 656-662, 2007.

VAGO, J. P.; NOGUEIRA, C. R.; TAVARES, L. P.; SORIANI, F. M.; LOPES, F.; RUSSO, R. C.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 92, p. 249-258, 2012.

VAN EEDEN, S. F.; BICKNELL, S.; WALKER, B. A.; HOGG, J. C. Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. H401-408, 1997.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; TUCKERMANN, J.; LIBERT, C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**, v. 154, p. 993-1007, 2013.

VARTICOVSKI, L.; CHAHWALA, S. B.; WHITMAN, M.; CANTLEY, L.; SCHINDLER, D.; CHOW, E. P.; SINCLAIR, L. K.; PEPINSKY, R. B. Location of sites in human lipocortin I that are phosphorylated by protein tyrosine kinases and protein kinases A and C. **Biochemistry**, v. 27, p. 3682-3690, 1988.

VISHWANATH, B. S.; FREY, F. J.; BRADBURY, M.; DALLMAN, M. F.; FREY, B. M. Adrenalectomy decreases lipocortin-I messenger ribonucleic acid and tissue protein content in rats. **Endocrinology**, v. 130, p. 585-591, 1992.

VOERMANS, C.; ROOD, P. M.; HORDIJK, P. L.; GERRITSEN, W. R.; VAN DER SCHOOT, C. E. Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells. **Stem Cells**, v.18, p.435-443, 2000.

VONG, L.; D'ACQUISTO, F.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; LAVAGNO, L.; FLOWER, R. J.; WITKO-SARSAT, V.; PERRETTI, M. Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 29998-30004, 2007.

WALTHER, A.; RIEHEMANN, K.; GERKE, V. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. **Mol. Cell.**, v. 5, p. 831-840, 2000.

WANG, W.; CREUTZ, C. E. Regulation of the chromaffin granule aggregating activity of annexin I by phosphorylation. **Biochemistry**, v. 31, p. 9934-9939, 1992.

WEBER, P. S.; MADSEN, S. A.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; BURTON, J. L. Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 83, p. 213-240, 2001.

WEBER, P. S.; TOELBOELL, T.; CHANG, L. C.; TIRRELL, J. D.; SAAMA, P. M.; SMITH, G. W. Mechanisms of glucocorticoid-induced down regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 815–827, 2004.

WEIN, S.; FAUROUX, M.; LAFFITTE, J.; DE NADAÏ, P.; GUAÏNI, C.; PONS, F.; COMÉRA, C. Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa. **Biochem. Pharmacol.**, v. 67, p. 1195-1202, 2004.

WEISS, L. Transmural cellular passage in vascular sinuses of rat bone marrow. **Blood**, v. 36, p. 189–208, 1970.

WITOWSKI, J.; PAWLACZYK, K.; BREBOROWICZ, A.; SCHEUREN, A.; KUZLAN-PAWLACZYK, M.; WISNIEWSKA, J.; POLUBINSKA, A.; FRIESS, H.; GAHL, G. M.; FREI, U.; JÖRRES, A. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. **J. Immunol.**, v. 165, p. 5814–5821, 2000.

WOODFIN, A.; VOISIN, M. B.; BEYRAU, M.; COLOM, B.; CAILLE, D.; DIAPOULI, F. M.; NASH, G. B.; CHAVAKIS, T.; ALBELDA, S. M.; RAINGER, G. E.; MEDA, P.; IMHOF, B. A.; NOURSHARGH, S. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. **Nat. Immunol.**, v. 12, p. 761-769.

WU, C. C.; CROXTALL, J. D.; PERRETTI, M.; BRYANT, C. E.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, p. 3473-3477, 1995.

YANG, Y.H.; SONG, W.; DEANE, J.A.; KAO, W.; OOI, J.D.; NGO, D.; KITCHING, A.R.; MORAND, E.F.; HICKEY, M.J. Deficiency of annexin A1 in CD4+ T cells exacerbates T cell-dependent inflammation. **J. Immunol.**, v. 190, p. 997-1007, 2013.

YAZAWA, H.; KATO, T.; NAKADA, T.; SENDO, F. Glucocorticoid hormone suppression of human neutrophil-mediated tumor cell cytostasis. **Int. J. Cancer.**, v. 81, p. 74-80, 1999.

YAZID, S.; LEONI, G.; GETTING, S. J.; COOPER, D.; SOLITO, E.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Antiallergic cromones inhibit neutrophil recruitment onto vascular endothelium via annexin-A1 mobilization. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 30, p. 1718-1724, 2010.

YAZID, S.; NORLING, L. V.; FLOWER, R. J. Anti-inflammatory drugs, eicosanoids and the annexin A1/FPR2 anti-inflammatory system. **Prostaglandins Other Lipid. Mediat.**, v. 98, p. 94-100, 2012.

YE, P.; GARVEY, P. B.; ZHANG, P.; NELSON, S.; BAGBY, G.; SUMMER, W. R.; SCHWARZENBERGER, P.; SHELLITO, J.; KOLLS, J. K. Interleukin-17 and lung

host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. **Am. J. Respir. Cell.Mol. Biol.**, v. 25, p.335–340, 2001.

YONA, S.; LIN, H.; DRI, P.; DAVIES, J. Q.; HAYHOE, R. P. G.; LEWIS, S. M.; HEINSBROEK, S. E. M.; BROWN, K. A.; PERRETTI, M.; HAMANN, J., TREACHER, D. F.; GORDON, S.; STACEY, M. Ligation of the adhesion-GPCR EMR2 regulates human neutrophil function. **FASEB J.**, v. 22, p. 741-751, 2008.

YUDT, M. R.; JEWELL, C. M.; BIENSTOCK, R. J.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 4319–4330, 2003.

ZOUKI, C.; OUELLET, S.; FILEP, J. G. The anti-inflammatory peptides, antinflammins, regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells. **FASEB J.**, v. 14, p. 572-580, 2000.

ANEXOS

**ANNEXIN A1 MODULATES BONE MARROW-BLOOD NEUTROPHIL
TRAFFICKING BY IMPACTING ON THE SDF-1 α /CXCR4 AXIS**

Isabel Daufenback Machado^a, José Roberto Santin^a, Ricardo Ambrósio Fock^a,
Cristiane Damas Gil^b, Sonia Maria Oliani^c, Mauro Perretti^d, Sandra Helena Poliselli
Farsky^{a,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil

^b Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP

^c Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

^d Centre for Biochemical Pharmacology, The William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK

Corresponding author:

Sandra HP Farsky - Tel.: +55 11 3091 1193

E-mail address: sfarsky@usp.br

Abstract

Migrating bone marrow granulocytes are CXCR4^{low} while senescent blood neutrophils are CXCR4^{high} and home to the bone marrow in response to stromal derived factor-1 α (SDF-1 α). Endogenous glucocorticoid and its secreted protein Annexin A1 (AnxA1) modulate bone marrow-blood trafficking, but the mechanism has not been fully elucidated. Using male AnxA1 knockout mice (*AnxA1*^{-/-}) we identified a novel pathway controlling granulopoiesis and neutrophil trafficking between the bone marrow and blood under physiological conditions. *AnxA1*^{-/-} mice showed enhanced granulocyte maturation in the bone marrow and blood neutrophilia. The control exerted by AnxA1 occurs via formyl peptide receptor 2 (FPR2), as similar data were found in wild type (WT) mice treated with Boc2 (Boc2 WT), a pan antagonist of FPR receptors, and reversed in *AnxA1*^{-/-} animals treated with the AnxA1 peptide Ac2-26 (Ac2-26 *AnxA1*^{-/-}). In addition, AnxA1 and FPR2 are constitutive in bone marrow granulocytes and their expressions are regulated by glucocorticoid receptor activation, suggesting that AnxA1/FPR2 actions mediate the control of glucocorticoids on granulopoiesis. In fact, ACTH injection mobilized AnxA1⁺ neutrophils into blood, via a mechanism dependent on cytosolic glucocorticoid receptor activation. Membrane expressions and numbers of CXCR4⁺ and CXCR2⁺ neutrophils were enhanced and reduced in *AnxA1*^{-/-} mice, respectively. The same profile of CXCR4⁺ and CXCR2⁺ neutrophils was also observed *in vivo* in Boc2 WT mice, and reversed in Ac2-26 *AnxA1*^{-/-} mice. Although *AnxA1*^{-/-} circulating neutrophils expressed high levels of CXCR4, chemotaxis to SDF-1 α was reduced. Together, the data herein presented highlight AnxA1 as a physiological mediator of granulopoiesis and neutrophil trafficking, by targeting the SDF-1 α / CXCR4 axis.

Keywords: RU38486; annexin A1 knockout animals; chemotaxis; CXCR2; formyl peptide receptor 2; Ac 2-26 peptide

1. Introduction

Bone marrow is a reservoir compartment of progenitor, blast and mature cells, which are continuously delivered into the circulation in large numbers - between 10^{11} and 10^7 neutrophils each day in humans and mice, respectively - to maintain homeostasis [1,2,3]. Although recent data suggests that a specific population of neutrophils may circulate for longer periods of time [4], the majority of these cells circulate for 6–8 hours, become senescent and migrate into different tissues. Approximately 30% of circulating senescent neutrophils migrate into bone marrow, where they become apoptotic to be phagocytosed by resident macrophages [5,6]. The efficient phagocytosis process contributes to granulopoiesis and delivery, as engulfing bone marrow macrophages secrete granulocyte-stimulating factor (G-CSF) to stimulate these processes [7,8].

Bone marrow-blood trafficking of neutrophils relies on alterations in membrane receptor expression that occur during cellular aging. In this context, circulating senescent neutrophils undergo a progressive decrease in CXCR2 expression and increased responsiveness to bone marrow stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α) through expression of CXCR4, which drives senescent neutrophils back to the bone marrow [5,6,9]. In addition, the CXCR4/CXCR2 balance contributes to the release of mature granulocytes from the bone marrow into blood, as migrating bone marrow granulocytes are CXCR4^{low} and CXCR2^{high} cells [10]. The relevance of the CXCR4/SDF-1 α axis in neutrophil trafficking is evidenced in CXCR4 knockout mice [11] and in individuals with WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis) congenital syndrome, caused by persistent CXCR4 expression. The resulting severe neutropenia detected in WHIM subjects reflects the retention of

mature granulocytes together with augmented apoptosis in the bone marrow [11,12,13,14,15].

The molecular mechanisms involved in granulocyte delivery during physiological or stress conditions are complex and not completely understood. Nonetheless, strong evidence has supported the involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Elevated levels of secreted glucocorticoids during the early phases of inflammatory processes inhibit peripheral neutrophil migration into inflamed tissues [16,17,18]; whilst, at the same time mature granulocytes are mobilized from the bone marrow into blood [19]. The same pattern of leukocyte trafficking is induced by high concentrations of synthetic glucocorticoid or by injection of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [20,21]. Interestingly, in the absence of stress conditions, neutrophilia has also been detected in animals deficient in glucocorticoid activity [22,23], indicating the existence of a tight physiological control on neutrophil trafficking by secreted glucocorticoids.

The molecular actions of glucocorticoids involve genomic and non-genomic mechanisms [24], and the genomic pathway seems to be responsible for the majority of the anti-inflammatory actions. It has been proposed that glucocorticoids control the leukocyte flux, under physiological or pathological conditions, through trans-repression and inhibition of the activities of pivotal transcription factors [25]. However, glucocorticoid/glucocorticoid receptor dimers can also trans-activate and induce important effectors with anti-inflammatory and immune-regulatory properties such as dual-specificity phosphatase 1 (DUSP-1) and annexin A1 (AnxA1) [26,27]. AnxA1 is a Ca^{+2} and phospholipid-binding protein inducible by glucocorticoids in different cells that displays an important role in the anti-inflammatory actions of hormones. It has been clearly shown that secreted AnxA1 binds to membrane formyl-peptide receptor

2 (FPR2) and inhibits neutrophil influx into inflamed tissues by inducing the detachment of neutrophils from endothelial cells in the postcapillary venules [21,28]. More recently, we have also shown that non-inflamed AnxA1 knockout mice (*AnxA1*^{-/-}) present elevated numbers of neutrophils in the bone marrow and in the peripheral blood, providing evidence of its role in the physiological control of neutrophil trafficking. The mechanism involved seems to be dependent on AnxA1 modulation of macrophage phagocytic activity in the bone marrow, as phagocytosis of apoptotic neutrophils returning to bone marrow from the blood is impaired in *AnxA1*^{-/-} mice [29].

In the present manuscript, we aimed to clarify the molecular mechanisms of AnxA1 on granulocyte maturation and bone marrow-blood neutrophil trafficking pathways. To our knowledge, we show for the first time that AnxA1, through FPR binding, is a physiological mediator of granulocyte maturation and trafficking, and the SDF-1 α /CXCR4 axis is a target of AnxA1's actions in bone marrow granulocyte delivery and neutrophil blood homing.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male wild-type (WT) and AnxA1 null (*AnxA1*^{-/-}) [30] 5- to 6-wk-old BALB/c mice were obtained from the Animal House of the School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (Brazil). Chow and water were available *ad libitum*. During experimental procedures, the animals were anaesthetized with ketamine/xylazine (77/7 mg/kg) to avoid any stress conditions. All animal procedures were performed according to protocols approved by the Ethics Committee on Animal Use of the School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – (CEUA/FCF/285) for the proper use and care of experimental animals.

2.2. Pharmacological treatments

The glucocorticoid receptor antagonist mifepristone (RU38486, 10 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in a solution of carboxymethyl cellulose (2 mg/ml), polysorbate 80 (50 µl/ml), ethanol (40 µl/ml) and phosphate buffered saline (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2 mM, phosphate buffer 10 mM, pH 7.2–7.4), and administered intraperitoneally (i.p.). Adrenocortropic hormone (ACTH; 5 µg/animal, i.p.; Synacthen[®]Depot, Novartis, Basel, Switzerland) or vehicle (PBS) were administered 4 hours before assays.

Ac2-26 peptide, the active peptide of AnxA1 (Tocris, Bristol, UK), was administered to *AnxA1*^{-/-} mice once per day during 4 consecutive days, i.p., at a dose of 1 mg/kg. The pan-FPR antagonist Boc2 (10 µg/mouse i.p., MP Biomedicals, UK) was administered once per day during four consecutive days. Doses and therapeutic schedules followed those previously described in the literature [31,32].

2.3. Haematological parameters

2.3.1. Blood

Animals were anaesthetized and whole blood samples were obtained via abdominal aorta punctures using EDTA (2 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA). Total cells were quantified using a Neubauer chamber. Differential leukocyte counts were performed on blood smears stained with May Grunwald–Giemsa solution (Sigma, St. Louis, MO, USA).

2.3.2. Bone marrow

Bone marrow cells were obtained by flushing the femoral cavity with 2 ml of McCoy's 5A medium (Sigma, St. Louis, MO, USA). The number of total cells was quantified in a Neubauer chamber. Differential counts were performed on the basis of 500 cells per slide smear stained with May Grunwald-Giemsa. The granulocytic lineage of the bone marrow was classified as being either blast, immature, band or mature. The intermediate cell class was considered to be promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes.

2.4. AnxA1 expression in neutrophils from bone marrow and blood by immunofluorescence

Blood and bone marrow leukocytes were prepared on 0.1% gelatin-coated glass coverslips. After 30 min, adherent cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.4% Tween-20/PBS for 15 min, blocked with 3% goat serum containing 0.1% BSA in PBS for 1 h, and then incubated with rabbit polyclonal anti-AnxA1 antibody (1:300; Invitrogen, Zymed Laboratories, Carlsbad, CA, USA) in PBS containing 1.5% goat serum overnight at 4 °C. After three rinses with PBS, the

samples were incubated with PE-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:100, Abcam, London, UK) in PBS containing 1.5% goat serum for 1 h at room temperature in the dark. The slides were then washed in PBS and stained with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min followed by three rinses with PBS. After mounting with fluorescent mounting media, the slides were observed under a Zeiss-Axioskop 2 fluorescence microscope (Carl Zeiss Meditec, Inc., San Antonio, TX, USA). Densitometric analysis of the AnxA1 immunostaining on neutrophils was performed on an arbitrary scale ranging from 0 to 255 using AxioVision software (Carl Zeiss Meditec, Inc., San Antonio, TX, USA).

2.5. Immunoenzymatic assay

To measure corticosterone levels by immunoenzymatic assay (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), samples from whole blood were obtained as described in section 2.3.1 without anticoagulant, and centrifuged for 10 min at 600 x g to obtain the serum samples. The SDF-1 α (R&D System, Minneapolis, MN, USA) concentration was determined in bone marrow perfusate obtained as described in section 2.3.2. The samples obtained from each experiment were analysed in duplicate in the same assay.

2.6. Flow cytometry

Leukocytes were isolated from blood collected from either the abdominal aorta or from the bone marrow as described in sections 2.3.1 and 2.3.2, respectively, to evaluate maturation phases of granulocytes according to Trotier et al. [33] and to evaluate CXCR2, CXCR4 and FPR2 expression. In brief, erythrocyte lysis was

performed using an ammonium chloride solution (0.13 M) on the blood samples, after which leukocytes were recovered after washing with PBS.

To analysis granulocyte maturation in the bone marrow, phenotypic labelling of three granulocyte maturational stages, immature (promyelocytes, myelocytes), intermediate (metamyelocytes, band cells) and mature (segmented neutrophils) was performed by using anti-Ly6G (Gr-1, PE conjugated rat anti-mouse Ly6G, BD PharMingen Technical, CA, USA, 50 mg/ml) and CD11b (FITC conjugated rat anti-mouse CD11b, BD PharMingen Technical, CA, USA, 50 mg/ml) antibodies. To separate monocyte cells, cells were labelled and gated with Ly6C^{med} (APC conjugated rat anti-mouse Ly6C, BD PharMingen Technical, CA, USA, 50 mg/ml). Mature neutrophils were Gr-1^{hi}/CD11b^{hi}, intermediated cells Gr-1^{hi}/CD11b^{med}, and immature cells were Gr-1^{med}/CD11b^{med/hi}.

FPR2 expression (FITC conjugated, diluted 1:100) was evaluated in bone marrow Ly6G/CD11 labelled leukocytes or blood neutrophils. 1×10^6 bone marrow or blood cells were incubated with antibodies (100 μ l, each) during 20 min at 4°C in the dark.

Other samples of leukocytes (1×10^6) from blood or bone marrow were incubated for 20 min at 4 °C in the dark with 100 μ l of monoclonal antibody against CXCR2 (PE conjugated, rat anti-mouse CXCR2, BD PharMingen Technical, CA, USA, 50 mg/ml) or CXCR4 (PE conjugated, rat anti-mouse CXCR4, BD PharMingen Technical, CA, USA, 50 mg/ml). All antibodies were diluted 1:100.

Immediately after the incubations, cells were analysed on a FACS Canto flow cytometer (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 cells were obtained and only morphologically viable leukocytes were considered for analysis.

Results were expressed as the percentage of positive cells and mean of fluorescence intensity (MFI).

2.7. In vitro neutrophil chemotaxis assay

Samples from whole blood were obtained as described in section 2.3.1, and the neutrophils were separated by a modified Percoll method [34]. A Percoll gradient was made by slowly adding 3 ml of 70% Percoll solution above 3 ml of 60% Percoll solution, both diluted in Hank's balanced salt solution (HBSS, GIBCO, Grand Island, NY, USA). Subsequently, 3 ml of whole blood was added slowly above the Percoll gradient and then centrifuged at 500 x g for 35 min at 22 °C with 2 m/s² acceleration/braking. After centrifugation, a halo between the 70 and 60% Percoll solutions containing the neutrophils was observed and collected.

Then, the neutrophils were washed with HBSS by centrifugation at 400 x g for 10 min at 22 °C. After washing, the neutrophils were resuspended at 2x10⁵ cells/ml in HBSS supplemented with Ca²⁺. In the next step, 25 µl of cell suspension from blood was loaded on the top well of a commercial Neuroprobe ChemoTx-101-8™ 96-well plate equipped with an 8-µm pore size filter (Neuroprobe, Leamington Spa, UK). As a chemoattractant, 1 ng/ml of SDF-1α was added in the bottom well. The chemotaxis assay with neutrophils from the blood was incubated for 2 h and a cell suspension from the bone marrow was incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂, after which neutrophils migrated from the blood were counted using a Neubauer chamber.

2.8. Statistical analysis

Means and standard errors of means (S.E.M.) of the data are presented and were compared by analysis of variance (ANOVA) or Tukey Multiple Comparisons Test with the level of significance defined as less than 0.05.

3. Results

3.1. AnxA1 and its FRP2 receptor are expressed in bone marrow granulocytes and modulate granulocyte maturation

Intracellular and membrane-associated AnxA1 and its receptor FPR2 are constitutively expressed in bone marrow granulocytes and blood neutrophils, and RU38486 treatment reduced their expression in both compartments (Fig. 1 and 2).

AnxA1 expression on granulocytes affects the maturation process, as numbers of intermediate, band and mature granulocytes in the bone marrow, as well as blood neutrophils, were enhanced in *AnxA1*^{-/-} mice (Fig. 3), suggesting that deficiency in AnxA1 causes an acceleration in the process of granulocyte maturation. Nonetheless, AnxA1 deficiency did not modify the number of blast cells (Fig. 3A).

Corroborating the role of AnxA1 and FPR2 on granulopoiesis, administration of Ac2-26 peptide into *AnxA1*^{-/-} mice reversed all alterations on granulopoiesis (Fig. 3). On the other hand, antagonism of FPRs in WT mice induced modifications on granulopoiesis similar to those observed in *AnxA1*^{-/-} mice (Fig. 3).

3.2. AnxA1 also modulates the delivery of mature granulocytes to blood

In order to confirm the evidence that AnxA1 is a physiological mediator of neutrophil delivery, blood neutrophils were counted after ACTH injection into WT or *AnxA1*^{-/-} mice. ACTH induced mobilization of a mature pool of cells, which were AnxA1⁺ neutrophils, from the bone marrow to blood, however an inverse expression of AnxA1 was observed in cells obtained from bone marrow (Fig. 4).

3.3. AnxA1 alters the profile of CXCR4⁺ cells in the bone marrow and blood

We have previously shown that *AnxA1*^{-/-} mice present neutrophilia [29], which was corroborated in the present manuscript, and the mechanisms involved have not been clarified. The CXCR4 expression pattern in the bone marrow and blood cells indicated the profile of the homing and clearance of circulating senescent neutrophils into bone marrow, as CXCR4^{high} cells in both compartments indicate the presence of senescent cells. In addition, this pattern has been confirmed using CXCR2^{low} cells [6].

Here, we verified that the circulating pool of CXCR4⁺ cells, as well as the level of CXCR4 expression *per cell*, is also enhanced in *AnxA1*^{-/-} mice (Fig. 5A and B); in contrast, CXCR2⁺ cells in the blood and the extent of receptor expression at the single cell level are reduced in *AnxA1*^{-/-} animals (Fig. 5C and D). This pattern of response was reversed by treating *AnxA1*^{-/-} mice with Ac-2-26 peptide (Fig. 5A-D). Conversely, treatment of WT mice with Boc2 enhanced and reduced the populations of CXCR4⁺ and CXCR2⁺ cells, respectively (Fig. 6A-D). In addition, Boc2 treatment enhanced the number of CXCR4⁺ granulocytes in the bone marrow (Fig. 6E), as we previously observed in *AnxA1*^{-/-} mice [29].

3.4 *AnxA1* controls SDF-1 α secretion and SDF-1 α -induced neutrophil chemotaxis

The elevated pool of CXCR4⁺ neutrophils in the blood of *AnxA1*^{-/-} mice may reflect the reduced chemotactic response to bone marrow SDF-1 α . This hypothesis was tested by analysis of the *in vitro* chemotactic response of circulating neutrophils to SDF-1 α . Corroborating our hypothesis, the data obtained showed that circulating neutrophils obtained from *AnxA1*^{-/-} animals were unable to migrate in response to SDF-1 α (Fig. 7A). It is important to note that levels of SDF-1 α in the bone marrow

were reduced by AnxA1 deletion (Fig.7B), which was reversed after 4 days with Ac2-26 treatment. On the other hand, Boc2 treatment also reduced SDF-1 α secretion (Fig. 7B).

4. Discussion

Although neutrophils are the most abundant immune cell type in humans, only 2% are found in the bloodstream, whilst they spend the majority of their life in the bone marrow. This pattern of cell distribution remains unaltered during homeostasis, but is rapidly altered under stress conditions [35,36]. Therefore, the molecular interactions of bone marrow granulocytes, stromal cells, sinusoids and microvessels are under the control of chemical mediators of stress [37,38,39,40]. We and others have shown that secreted or exogenous glucocorticoids modulate both physiological and stress-mediated granulopoiesis and bone marrow granulocyte delivery [23,33,41]. Here we show that AnxA1, a protein secreted in response to glucocorticoid action, controls granulopoiesis and bone marrow/blood/bone marrow trafficking by modulating granulocyte maturation phases and the CXCR4/SDF-1 α axis.

We had previously demonstrated that an absence of circulating glucocorticoids, or blockade of glucocorticoid receptors, affects the production, maturation and delivery of granulocytes from the bone marrow, as visualized by the greater numbers of blast, immature and band cells accompanying blood neutrophilia in rats [23]. Morphological and flow cytometric analysis carried out in the present manuscript showed that the actions of secreted glucocorticoids on maturation and delivery, but not on the production of granulocytes, may involve AnxA1 secretion and its interaction with FPR2, in view of the findings produced with *AnxA1*^{-/-}, Ac2-26 *AnxA1*^{-/-} or Boc2 WT treated animals. Our previous study had already suggested that AnxA1 does not control the production of granulocytes, as levels of G-CFU, as well as the expansion of granulocytes after G-CSF treatment, were equivalent in *AnxA1*^{-/-} and WT mice [29]. The Boc2 FPR antagonist was employed, as it has been widely

used to evaluate the actions of AnxA1 [31,32], and the selectivity of other antagonists, such as WRW4, has been discussed [42,43,44,45,46].

Supporting the role of AnxA1 in the maturation and delivery of granulocytes, we showed that AnxA1 and FPR2 expressions are constitutive in bone marrow granulocytes. Their expression is under the control of secreted glucocorticoid via a mechanism dependent on glucocorticoid cytosolic receptor activation, suggesting that glucocorticoid/AnxA1 modulate granulocyte maturation in homeostasis. In accordance with this idea, neutrophilia induced by ACTH injection results from rapid mobilization of AnxA1⁺ neutrophils. ACTH-induced neutrophilia is also dependent on glucocorticoid action, as ACTH activates the HPA axis and enhances glucocorticoid levels in the blood [40], and prior treatment with RU38486 inhibited ACTH-induced neutrophilia (data not shown). It has been already shown that exogenous AnxA1 blocked ACTH or PAF-induced neutrophilia [4,19,47,48,49]; nevertheless, ACTH-induced mobilization of AnxA1⁺ cells has been shown here for the first time.

Our previous data showed that the elevated number of neutrophils in the bone marrow in *AnxA1*^{-/-} mice reflects the accumulation of senescent homing CXCR4⁺ neutrophils, caused by their impaired phagocytosis by bone marrow macrophages [29]. As *AnxA1*^{-/-} animals also present blood neutrophilia, which is not dependent on elevated granulocyte chemotaxis to CXCL-1/CXCR2 [29], we here hypothesized that neutrophilia could be dependent on modifications in the CXCR4/SDF-1 α axis. In fact, CXCR4 expression *per cell* as well as the number of CXCR4⁺ neutrophils was enhanced in the blood of *AnxA1*^{-/-} mice. In addition, CXCR2 expression was reduced in neutrophil membranes, which, in accordance with elevated CXCR4 expression, shows that deficiency in AnxA1 lengthens the lifespan of neutrophils in the blood. It is noteworthy to mention that similar profiles of neutrophils in both compartments and

membrane expressions of CXCR4 and CXCR2 were found in Boc2 WT treated animals and were reversed if *AnxA1*^{-/-} mice were supplemented with Ac2-26.

Enhanced expression of CXCR4 in neutrophil membranes in *AnxA1*^{-/-} mice could be controversial for the hypothesis of a longer lifespan in blood, as they could be more responsive to bone marrow derived SDF-1 α . In contrast, an *in vitro* chemotaxis assay showed reduced migration of blood neutrophils from *AnxA1*^{-/-} mice in response to SDF-1 α , suggesting that AnxA1 also modulates CXCR4 functions. CXCR4 is a seven-domain transmembrane receptor linked to a G-protein coupled receptor [GPCR; 50,51], and the mechanism of AnxA1's influence on receptor functions requires further investigation.

AnxA1 exerts an additional control on the CXCR4/SDF-1 α axis, as levels of the chemotactic agent in the medullar perfusate of *AnxA1*^{-/-} mice were lower than those measured in WT mice. The expression and actions of AnxA1 produced by stromal bone marrow cells has not previously been shown, and further studies are required to evidence the potential mechanisms of action.

Recent evidence indicates a previously unappreciated relationship of the SDF-1 α /CXCR4 axis and the control of neutrophil traffic exerted by secreted glucocorticoids. It has only been shown that pharmacological doses of glucocorticoids upregulate CXCR4 expression and CXCR4-induced signalling pathways in lymphocytes, leading to enhanced proliferation, actin polymerisation, Rac activation and cell migration in response to SDF-1 α [52,53,54,55]. Based on the current findings and the fact that AnxA1 protein is secreted in response to glucocorticoid actions, we infer the SDF-1 α /CXCR4 axis may be a potential downstream pathway mediating the control exerted by secreted glucocorticoids.

Corroborating the role of AnxA1 on the life span of neutrophils, it has been shown that AnxA1, Ac2-26 or Ac2-50 peptides all induced neutrophil apoptosis during different disease states [56,57,58], contributing to reinforcing the role of AnxA1 in resolving inflammation. Nevertheless, the role of physiological AnxA1 in neutrophil apoptosis has not been established. Dalli et al. [29] has only shown enhanced numbers of apoptotic neutrophils in the bone marrow, which may reflect their impaired phagocytosis by macrophages.

Recently published data have broken old paradigms on neutrophil production, life span, localization and functions, suggesting that neutrophils are plastic cells that modify their phenotype according to stimuli [59,60]. The molecular control of these phenomena is not fully understood, but our results suggest AnxA1 may be a player in these phenomena. It is now evident that AnxA1 exerts physiological actions on the maturation, life span and locomotion of neutrophils, and therefore is relevant in the mounting and resolution of innate and adaptive host responses.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP for financial support (Grants No. 2010/08402-2, 2010/16828-0 and 2011/00128-1). SHP Farsky and SM Oliani are fellows of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq). M Perretti is supported by a programme grant (08667/Z/08/Z) of The Wellcome Trust UK.

References

- [1] Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin* 1976; 58: 705-15.
- [2] Price TH, Chatta GS, Dale DC. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood* 1996; 88: 335-40.
- [3] Boxio R, Bossenmeyer-Pourié C, Steinckwich N, Dournon C, Nüsse O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leukoc Biol* 2004; 75:604-11.
- [4] Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010; 116: 625-7.
- [5] Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* 2008; 22: 3111-9.
- [6] Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunol* 2008; 125: 281-8.
- [7] Metcalf D. Regulation of granulocyte and monocyte-macrophage proliferation by colony stimulating factor (CSF): a review. *Exp Hematol* 1973; 1: 185-201.
- [8] Stanley ER, Cifone M, Heard PM, Defendi V. Factors regulating macrophage production and growth: identity of colony-stimulating factor and macrophage growth factor. *J Exp Med* 1976; 143: 631-47.
- [9] Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K et al. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 711-7.
- [10] Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 2003; 19: 583-93.
- [11] Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 2009; 113: 4711-9.
- [12] Wetzler M, Talpaz M, Kleinerman ES, King A, Huh YO, Gutterman JU et al. A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 1990; 89: 663-72.

- [13] Gorlin RJ, Gelb B, Diaz GA, Lofsness KG, Pittelkow MR, Fenyk JR. WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet* 2000; 91: 368-76.
- [14] Dotta L, Tassone L, Badolato R. Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med* 2011; 11: 317-25.
- [15] Liu Q, Chen H, Ojode T, Gao X, Anaya-O'Brien S, Turner NA et al. WHIM syndrome caused by a single amino acid substitution in the carboxy-tail of chemokine receptor CXCR4. *Blood* 2012; 120: 181-9.
- [16] Garcia-Leme J, Hamamura L, Migliorini RH, Leite MP. Experimental diabetes and inflammatory reactions in the rat. *Agents Actions Suppl* 1973; 3: 380-1.
- [17] Leme JG, Schapoval EE. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Br J Pharmacol* 1975; 53: 75-83.
- [18] Flower RJ, Parente L, Persico P, Salmon JA. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. *Br J Pharmacol* 1986; 87: 57-62.
- [19] Harris JG, Flower RJ, Perretti M. Endogenous corticosteroids mediate the neutrophilia caused by platelet-activating factor in the mouse. *Eur J Pharmacol* 1995; 283: 9-18.
- [20] Hetherington SV, Quie PG. Human polymorphonuclear leukocytes of the bone marrow, circulation, and marginated pool: function and granule protein content. *Am J Hematol* 1985; 20: 235-46.
- [21] Yang L, Yang JB, Chen J, Yu GY, Zhou P, Lei L et al. Enhancement of human ACAT1 gene expression to promote the macrophage-derived foam cell formation by dexamethasone. *Cell Research* 2004; 14: 315-23.
- [22] Cavalcanti DM, Lotufo CM, Borelli P, Tavassi AM, Pereira AL, Markus RP et al. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. *Mol Cell Endocr* 2006; 249: 32-9.
- [23] Cavalcanti DM, Lotufo CM, Borelli P, Ferreira ZS, Markus RP, Farsky SH. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol* 2007; 152:1291-300.
- [24] Rhen T, Cidlowski JA. Anti-inflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Eng J Med* 2005; 353: 1711-23.
- [25] Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Mol Cell Endocr* 2012 [Epub ahead of print].

- [26] Clark AR, Martins JR, Tchen CR. Role of dual specificity phosphatases in biological responses to glucocorticoids. *J Biol Chem* 2008; 283: 25765-9.
- [27] Clark AR, Belvisi MG. Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacol Ther* 2012; 134: 54-67.
- [28] Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 62-70.
- [29] Dalli J, Jones CP, Cavalcanti DM, Farsky SH, Perretti M, Rankin SM. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J* 2012; 26: 387-96.
- [30] Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark MJ et al. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J* 2003; 17: 253-255.
- [31] Gavins FN, Hughes EL, Buss NA, Holloway PM, Getting SJ, Buckingham JC. Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. *FASEB J* 2012; 26:4977-89.
- [32] Girol AP, Mimura KK, Drewes CC, Bolonheis SM, Solito E, Farsky SH et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. *J Immunol* 2013; 190: 5689-701.
- [33] Trottier MD, Newsted MM, King LE, Fraker PJ. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 2028-33.
- [34] Eggleton P. Separation of cells using free flow electrophoresis. In: Fisher, D, Francis, GE, Rickwood D, editors. *Cell Separation*, Oxford: Oxford University Press; 1998, p. 213-52.
- [35] Zinkl JG. The leukocytes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1981; 11: 237-63.
- [36] Pittman K, Kubes P. Damage-Associated Molecular Patterns Control Neutrophil Recruitment. *J Innate Immunol* 2013; 5:315-23.
- [37] Mishler JM, Emerson PM. Development of Neutrophilia by serially increasing doses of dexamethasone. *Br J Hematol* 1977; 36: 249-57.
- [38] Price TH. The use of G-CSF in normal neutrophil donors. *Ann Med Interne (Paris)* 2000; 151: 115-22.
- [39] Barker S, Scott M, Chan GT. Corticosteroids and monocytosis. *N Z Med J* 2012; 125:76-8. *New Zealand Medical Journal* 2012; 125: 76-78.

- [40] Zieziulewicz TJ, Mondal TK, Gao D, Lawrence DA. Stress-induced effects, which inhibit host defenses, alter leukocyte trafficking. *Cell Stress Chaperones* 2013; 18:279-91.
- [41] Inamdar DLS, Jayamma Y. Acceleration of neutrophil precursors' maturation and immunostimulation of CD3+, CD4+ lymphocytes by stanozolol in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012;129:172-8.
- [42] John CD, Sahni V, Mehet D, Morris JF, Christian HC, Perretti M et al. Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. *FASEB J* 2007; 21: 1037-46.
- [43] Perretti M, Croxtall JD, Wheller SK, Goulding NJ, Hannon R, Flower RJ. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med* 1996; 2: 1259-62.
- [44] Harris JG, Flower RJ, Perretti M. Alteration of neutrophil trafficking by a lipocortin 1 N-terminus peptide. *Eur J Pharmacol* 1995; 279: 149-57.
- [45] Möhle R, Drost AC. G protein-coupled receptor crosstalk and signaling in hematopoietic stem and progenitor cells. *Ann NY Acad Sci* 2012; 1266: 63-7.
- [46] Ratajczak MZ, Kim C, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. The expanding family of bone marrow homing factors for hematopoietic stem cells: stromal derived factor 1 is not the only player in the game. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012:758512.
- [47] Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T et al. IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 642-9.
- [48] Curnow SJ, Wloka K, Faint JM, Amft N, Cheung CM, Savant V et al. Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J Immunol* 2004; 172: 7154-61.
- [49] Ghosh MC, Baatar D, Collins G, Carter A, Indig F, Biragyn A et al. Dexamethasone augments CXCR4-mediated signaling in resting human T cells via the activation of the Src kinase Lck. *Blood* 2009; 113: 575-84.
- [50] Moustaki A, Argyropoulos KV, Baxevasanis CN, Papamichail M, Perez SA. Effect of the simultaneous administration of glucocorticoids and IL-15 on human NK cell phenotype, proliferation and function. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60:1683-95.
- [51] Li JL, Ng LG. Peeking into the secret life of neutrophils. *Immunol Res* 2012; 53:168-81.

[52] Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol* 2012; 2:120-34.

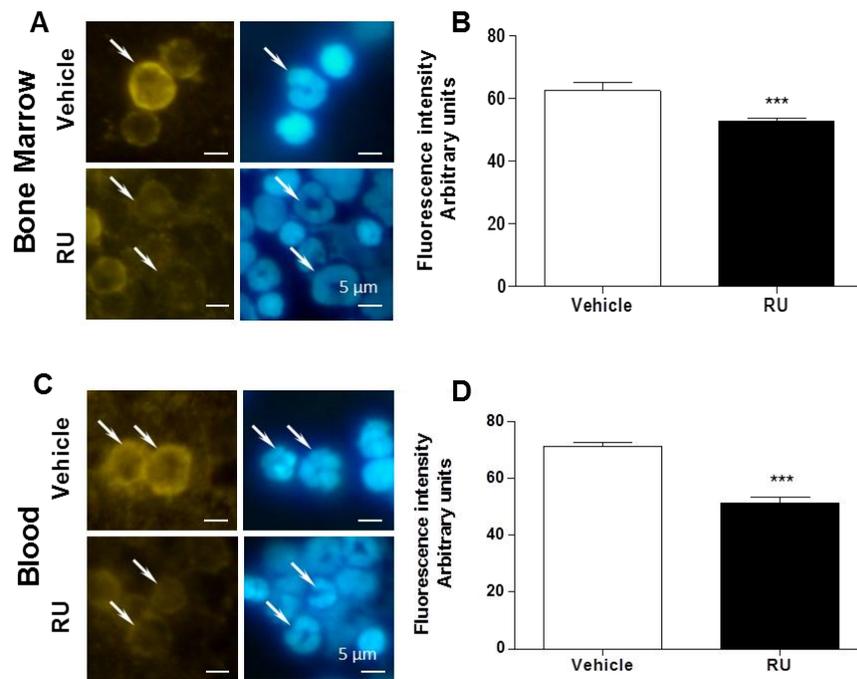


Figure 1. AnxA1 expression in neutrophils from bone marrow and peripheral blood in vehicle or RU38486-treated mice. Balb/C wild type mice were treated with either vehicle or RU38486 (RU) (10 mg/kg i.p., 24 h and 2 h before sacrifice). (A) and (C) Representative images of AnxA1 expression and DAPI counterstaining of neutrophils (arrows) in the bone marrow and blood, respectively, after vehicle or RU treatments. Densitometric analysis of bone marrow (B) and blood neutrophils (D) immunostained for AnxA1. Data are expressed as mean \pm s.e.m of arbitrary units (n=6 animals per group). *** P <0.001 vs. vehicle.

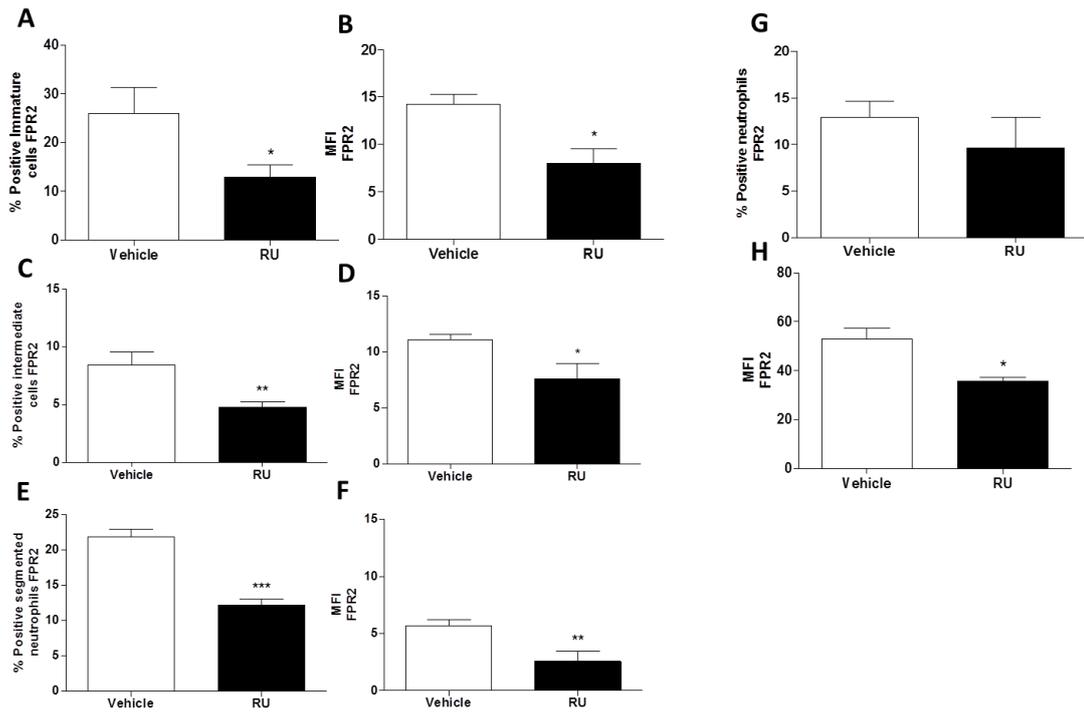


Figure 2. FPR2 expression in bone marrow and blood leukocytes from animals treated with RU38486. Balb/C wild type mice were treated with either vehicle or RU38486 (RU) (10 mg/kg i.p., 24 h and 2 h before sacrifice) (A, C, and E) % FPR2-positive cells in bone marrow, (G) % FPR2-positive cells in blood, (B, D, and F) FPR2 expression *per cell* in leukocytes from bone marrow and (H) FPR2 expression *per cell* in leukocytes from blood. Data are expressed as mean \pm s.e.m. (n=6 animals per group).. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P < 0.001 vs. respective controls.

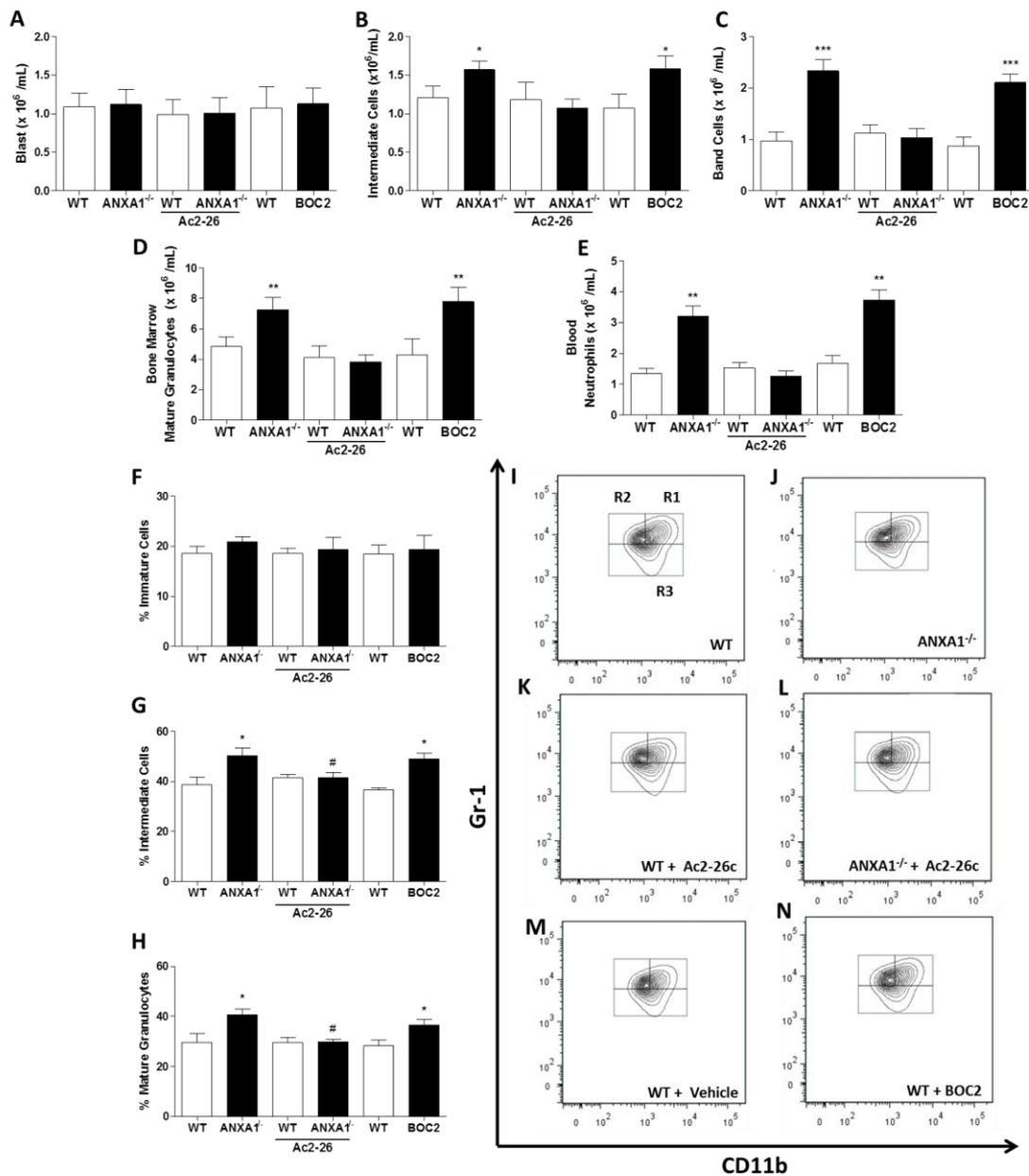


Figure 3. Number of cells in the bone marrow and blood in *Anxa1*^{-/-}, Ac2-26 *Anxa1*^{-/-} and Boc2 WT treated mice. *Anxa1*^{-/-} mice were treated with either vehicle or peptide Ac2-26 (1 mg/kg, once per day during 4 consecutive days, i.p.) and Balb/C wild type mice were treated with either vehicle or Boc2 (10µg/mouse once per day during 4 consecutive, i.p.). (A) Number of blasts, (B) intermediate cells, (C) bands, and (D) mature granulocytes in the bone marrow, (E) neutrophils in the peripheral blood. Phenotypic labelling of three granulocyte maturational stages by flow cytometry, (F) Number of immature cells (R3 - Promyelocytes, myelocytes), (G) intermediate cells (R2 - metamyelocytes, band cells), (H) mature neutrophils (R1 - segmented

neutrophils) in the bone marrow, and (I-N) Representative images of cytometric analysis. Data are expressed as mean \pm s.e.m. (n=6 animals per group). * P <0.05; ** P <0.01 and *** P <0.001 vs. respective controls.

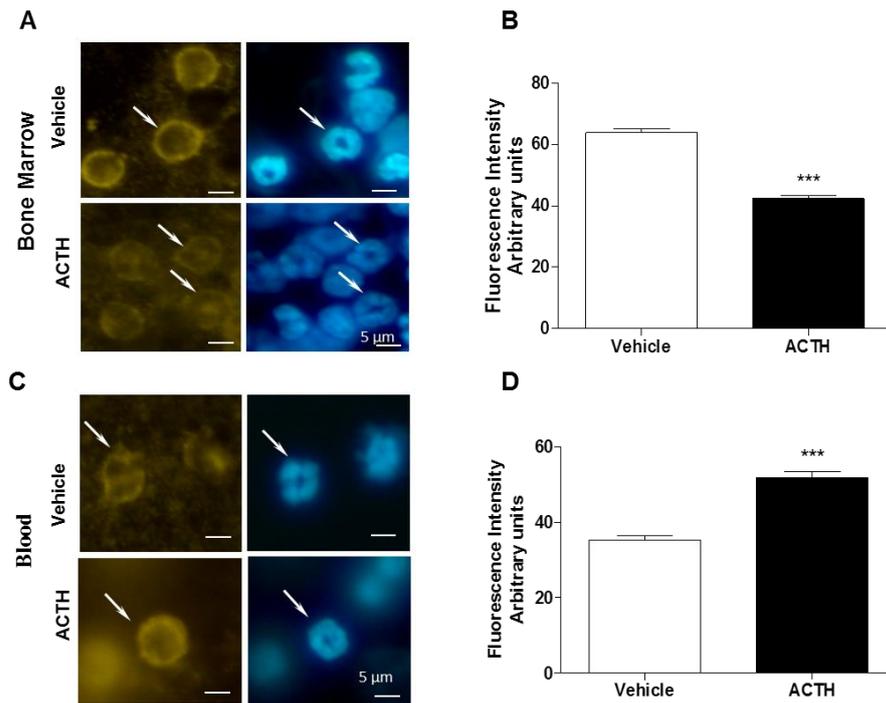


Figure 4. Effect of ACTH treatment on AnxA1 expression in neutrophils from bone marrow and peripheral blood. Balb/C wild-type mice were treated with either vehicle or ACTH (5 μ g/animal, i.p., 4 h before sacrifice). (A) and (C) Representative images of AnxA1 expression and DAPI counterstaining of neutrophils (arrows) in the bone marrow and blood, respectively, after vehicle or ACTH treatments. Quantitative analysis of AnxA1 immunostaining on bone marrow (B) and blood neutrophils (D). Data are expressed as mean \pm s.e.m in arbitrary units (n=6 animals per group). *** P <0.001 vs. vehicle.

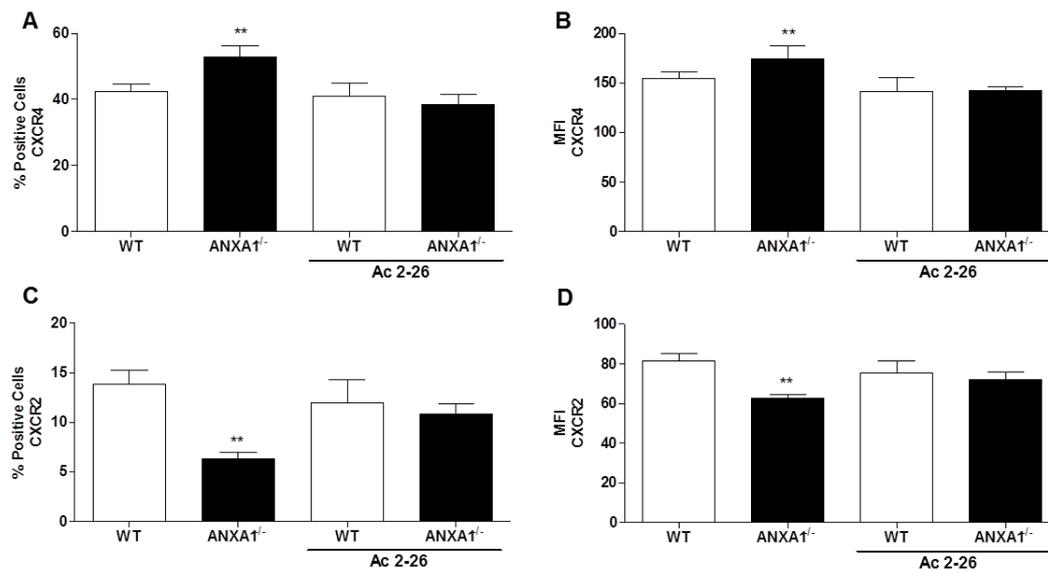


Figure 5. CXCR4 and CXCR2 expression in circulating neutrophils from Balb/C wild type, *AnxA1*^{-/-} and Ac-26 *AnxA1*^{-/-} mice. *AnxA1*^{-/-} mice were treated with vehicle or peptide Ac2-26 (1 mg/kg, once per day, during 4 consecutive days, i.p.). (A) % positive CXCR4 cells, (B) CXCR4 expression *per cell*, (C) % positive CXCR2, (D) CXCR2 expression *per cell*. Data are expressed as mean \pm s.e.m. (n=6 animals per group). ***P* < 0.01 vs. wild type mice.

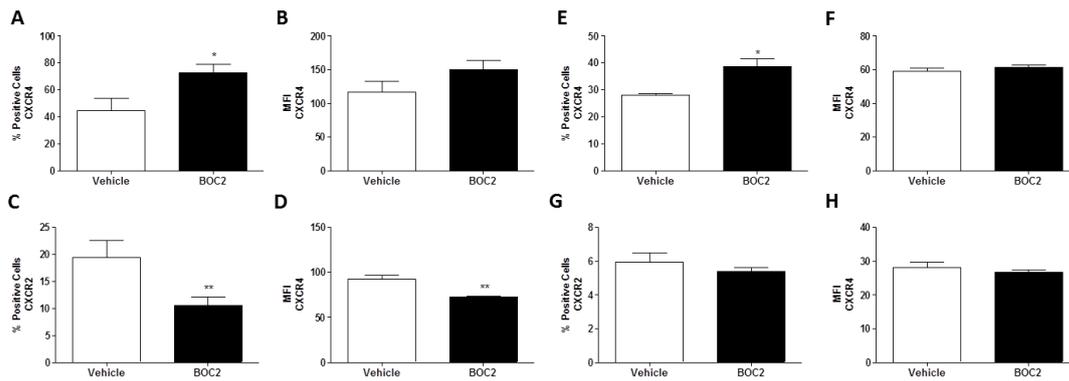


Figure 6. CXCR4 and CXCR2 expression in bone marrow and circulating neutrophils from Balb/C wild type and Boc2 WT treated mice. Balb/C wild type mice were treated with either vehicle or Boc2 (10 μ g/mouse once per day during 4 consecutive days, i.p.). (A and E) % positive CXCR4 cells in the blood and bone marrow, (B and F) CXCR4 expression *per cell* in the blood and bone marrow, (C and G) % positive CXCR2 cells in the blood and bone marrow and (D and H) CXCR2 expression *per cell* in the blood and bone marrow. Data are expressed as mean \pm s.e.m. (n=6 animals per group). * P <0.05 and ** P < 0.01 vs. wild type mice.

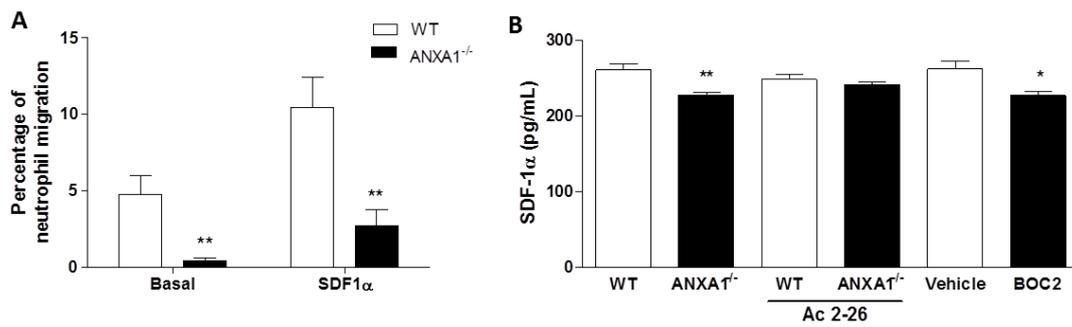


Figure 7. AnxA1 and FPR effects on neutrophil migration and SDF-1 α secretion. *AnxA1*^{-/-} mice were treated with either vehicle or peptide Ac2-26 (1 mg/kg, once per day during 4 consecutive days, i.p.) and Balb/C wild type mice were treated with either vehicle or Boc2 (10 μ g/mouse once per day during 4 consecutive days, i.p.). (A) Blood neutrophil chemotactic response to SDF-1 α ; (B) SDF-1 α levels. Data are expressed as mean \pm s.e.m. (n=6 animals per group). **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 vs. respective controls.