

Tatiana Aparecida Pimentel

**ANÁLISE DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DA PROTEÍNA  
ANEXINA 1 NO MODELO DE ARTRITE EXPERIMENTAL E  
REUMATÓIDE HUMANA**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Maria Oliani

São Paulo

2010

Pimentel, Tatiana Aparecida

**Análise das células inflamatórias e da proteína anexina 1 no modelo de artrite experimental e reumatóide humana / Tatiana Aparecida Pimentel.** -- São Paulo, 2010.

xv, 93f.

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Morfologia.**

Título em inglês: Analysis of the inflammatory cells and annexin 1 protein in the experimental model arthritis and in the human rheumatoid .

1. Anexina 1. 2. Artrite experimental e reumatóide humana. 3. Mastócito. 4. Neutrófilo. 5. Linfócito.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E GENÉTICA**

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Sima Godosevicius Katz

Coordenadora da Pós-Graduação: Profa. Dra. Janete Maria Cerutti

*"Antes do compromisso há hesitação, a oportunidade de recuar, a ineficácia permanente.  
Em todo ato de iniciativa (e de criação), há uma verdade elementar  
cujo desconhecimento destrói muitas idéias e planos esplêndidos:  
no momento em que nos comprometemos de fato, a Providência também age.  
Ocorre toda espécie de coisas para nos ajudar, coisas que de outro modo nunca  
ocorreriam.  
Toda uma cadeia de eventos emana da decisão, fazendo vir em nosso favor todo tipo  
de encontros, de incidentes e de apoio material imprevistos  
que ninguém poderia sonhar que surgiria em seu caminho.  
Começa tudo o que possas fazer, ou que sonhas poder fazer.  
A ousadia traz em si o gênio, o poder e a magia."*

*Goethe*

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã, minhas certezas, pelo esforço e por tantas outras  
razões...

Muito Obrigada!

À minha orientadora, Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, a quem dedico toda a minha admiração e respeito, pelo convívio, brilho e profissionalismo. Minha gratidão pela amizade e pelas valorosas contribuições, por meio de questionamentos e argumentações para construção desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Àqueles que me mostraram que nada é possível sem apoio, agradeço:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas Bolsas de Mestrado (processo 2005/51875-0) e Doutorado Direto (2007/55348-0).

À Profa. Dra. Janete Maria Cerutti, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Morfologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina (EPM) e ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith, Vice-Reitor da UNIFESP e ex-Chefe do Programa de Pós-graduação, por possibilitarem a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), em especial ao Departamento de Biologia, pelo uso de suas dependências.

Aos Professores Roderick J. Flower, Mauro Perretti e Dr. Panos Kabouridis, do *William Harvey Research Institute (WHRI), Barts and The London*, pelo apoio e orientação durante o meu estágio realizado em Londres.

À Thaís Santana Gastardelo e ao Leandro Pires Araujo, pela paciência e carinho em momentos importantes para mim.

Às queridas amigas Ana Cláudia Polli Lopes e Cristiane Damas Gil, exemplos de ética.

Aos companheiros do Laboratório de Morfologia do IBILCE, Ana Paula Girol, Bruna Stuqui, Caroline Zanon, Esther Emanuella da Cunha, Fernanda Vargas e Silva Castanheira, Kallyne Kioko Mimura, Lucas Azevedo, Maristela Oliveira, Rodrigo Antônio Parra Teixeira e Pierre Sebastião da Silva.

À Sílvia Cristina B. Abuchaim, secretária da Pós-graduação em Morfologia da UNIFESP, pela gentileza e ajuda constante.

Aos amigos Adriano Mendes Junior, Aline Paula Furlani, Ana Carolina Birolli, Eloísa Porto, Fernando Polli, Fulvio Schiavo, Hélio Bertoncetto Neto, Márcio Gomes Figueiredo, Marcos Suehara, Michely Aline Trevizan, Régis Guiraldo e Rodrigo Monteiro, simplesmente pessoas essenciais.

Aos meus colegas do *Centre for Biochemical Pharmacology, WHRI*, Londres, pelo apoio nas dificuldades e participação nas descobertas.



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	iv
AGRADECIMENTOS.....	vi
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xii
PREFÁCIO .....	xiii
RESUMO .....	xiv
INTRODUÇÃO .....	11
INTRODUÇÃO .....	1
A superfamília da proteína anexina .....	2
Anexina 1 .....	3
Anexina 1 e seus receptores para peptídeos formilados (FPRs) .....	6
Expressão da anexina 1 nos processos inflamatórios.....	8
CONCLUSÕES .....	15
REFERÊNCIAS.....	16
PUBLICAÇÕES .....	26
An essential role for mast cells as modulators of neutrophils influx in collagen- induced arthritis in the mouse.....	26
Resumo .....	27
Abstract .....	29
Introduction.....	31
Materials and Methods .....	33
Results .....	36
Discussion .....	39
References .....	44
Figure Legends .....	48
Tables.....	50
Figures .....	53

Differential expression of the anti-inflammatory annexin 1 protein and its receptor FPRL-1 in active and remissive human rheumatoid arthritis .....	57
Resumo .....	58
Summary .....	60
Introduction.....	61
Results .....	63
Discussion .....	65
Materials and Methods .....	68
References .....	72
Figure Legend .....	76
ANEXO 1 .....	81
ANEXO 2 .....	89
ABSTRACT .....	92

## LISTA DE FIGURAS

### Publicações

#### **An essential role for mast cells as modulators of neutrophils influx in collagen-induced arthritis in the mouse**

Figure 1. Development and progression of collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1J mice.....	53
Figure 2. Neutrophils migration after CIA within the synovial tissue of digits and knees joints. ....	54
Figure 3 cells in the digits and knees synovial tissue: histopathologic manifestations and quantification. ....	55
Figure 4. Synovial tissue of the digits after prednisolone and sodium nedocromil therapy.....	56

#### **Differential expression of the anti-inflammatory annexin 1 protein and its receptor fpri-1 in active and remissive human rheumatoid arthritis**

Figure 1. Density and co-localization of Anx-A1 and FPRL-1 immunogold particles in circulating lymphocytes.....	80
---	----

## LISTA DE TABELAS

### Publicações

#### **An essential role for mast cells as modulators of neutrophils influx in collagen-induced arthritis in the mouse**

Table 1. Treatment of CIA mice with prednisolone and nedocromil affects clinical scores and paw volumes. ....	50
Table 2. Neutrophils and mast cells migration profile after prednisolone and nedocromil therapy in the digits. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Table 3. Neutrophils and mast cells migration profile after prednisolone and nedocromil therapy in the knees. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

#### **Differential expression of the anti-inflammatory annexin 1 protein and its receptor fpri-1 in active and remissive human rheumatoid arthritis**

Table 1. Clinical data and pharmacological treatment of the active rheumatoid arthritis patients .....	77
Table 2. Clinical data and pharmacological treatment of the remissive rheumatoid arthritis patients .....	78
Table 3. Density of the anti-inflammatory annexin 1 protein (Anx-A1) and the formyl peptide receptor like-1 (FPRL-1) immunogold particles in lymphocytes from the peripheric blood. ....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>%:</b> porcentagem	<b>FPRL:</b> receptor humano para peptídeos formilados- <i>like</i>
<b>≥:</b> maior ou igual	<b>GC:</b> glicocorticoide
<b>α:</b> alfa	<b>GM-CSF:</b> fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos
<b>ALXR:</b> receptor da lipoxina A4	<b>hr-Anx-A1:</b> proteína anexina 1 recombinante humana
<b>Ac2-26:</b> Peptídeo da região N-terminal da proteína anexina 1	<b>HUGO:</b> <i>Human Gene Organization</i>
<b>Anx:</b> proteína anexina	<b>IL:</b> interleucina
<b>Anx-A1:</b> proteína anexina 1	<b>IFN-γ:</b> interferon tipo gama
<b>Anx-A1:</b> gene da proteína anexina 1	<b>KC:</b> quimiocina derivada de queratinócito
<b>AR:</b> artrite reumatóide	<b>kDa:</b> kilodaltons
<b>Boc:</b> antagonista do receptor para peptídeos formilados - FPR	<b>mM:</b> milimols
<b>C5a:</b> convertase 5 do sistema do complemento	<b>mRNA:</b> ácido ribonucléico mensageiro
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b> íons cálcio	<b>NF-κB:</b> fator nuclear κB
<b>CD:</b> molécula de superfície celular ( <i>cluster of differentiation</i> )	<b>PLA2:</b> fosfolipase A2
<b>CD3/CD8:</b> receptores de células T	<b>TCR:</b> receptor de linfócitos T ( <i>T cell receptor</i> )
<b>DMARD:</b> droga modificadora da doença ( <i>disease modifying anti-rheumatic drugs</i> )	<b>Th1:</b> linfócito T auxiliar de resposta tipo 1
<b>FPR:</b> receptor para peptídeos formilados	<b>Th2:</b> linfócito T auxiliar de resposta tipo 2
<b>Fpr, Fpr-rs:</b> genes dos receptores murinos para peptídeos formilados	<b>TCD4<sup>+</sup>:</b> célula T helper
	<b>TNF-α:</b> fator de necrose tumoral alfa

## PREFÁCIO

Alguns fundamentos das atividades dos mastócitos e dos neutrófilos, importantes células inflamatórias, foram relatados no desenvolvimento da artrite inflamatória experimental. Enfocamos também o efeito da proteína anti-inflamatória anexina 1 (Anx-A1) durante a artrite reumatóide humana, destacando a expressão da proteína e do seu receptor para peptídeos formilados (FPRs).

Esta tese é o resultado final de dois trabalhos realizados durante o período do Doutorado Direto, sendo dois deles submetidos à publicação em revistas indexadas internacionais (*Laboratory Investigation* e *European Journal of Immunology*). O conteúdo das duas publicações está correlacionado, possibilitando a integração das mesmas no trabalho de revisão presente na Tese de Doutorado. As investigações discutidas na revisão foram anexadas na íntegra. Em anexo está incluído um artigo que participei como colaboradora, publicado na revista estrangeira *Inflammation Research*, cujo assunto também inclui o mecanismo de ação dos mastócitos no processo inflamatório crônico.

Os trabalhos aqui descritos relacionam a regulação dos medidores pró-inflamatórios dos mastócitos na quimiotaxia dos neutrófilos no modelo de artrite induzida por colágeno (CIA), e a mobilização da proteína Anx-A1 e do receptor FPR nos linfócitos circulantes de pacientes com artrite reumatóide em atividade ou em remissão.

## RESUMO

A artrite reumatóide é uma doença caracterizada por formação de autoanticorpos, inflamação crônica e edema articular, resultando em lesão das articulações afetadas e do osso adjacente. No tratamento dessa doença, tem sido utilizado glicocorticóides (GCs), que induzem a expressão de genes dos mediadores anti-inflamatórios, como a proteína anexina 1 (Anx-A1), e a regulação dos pró-inflamatórios. Na patogênese da artrite, estão envolvidas células inflamatórias como os mastócitos, que, sob ativação, liberam potentes mediadores pró-inflamatórios contidos nos seus grânulos citoplasmáticos. No presente estudo, avaliamos a ocorrência dos mastócitos na evolução da artrite induzida por colágeno (CIA) e os seus efeitos sob os neutrófilos, leucócitos que auxiliam na promoção da inflamação articular. As avaliações dos volumes de patas dos camundongos experimentais mostraram que os sinais clínicos da artrite aumentaram gradualmente, até 42 dias após a imunização com o colágeno. As análises dos joelhos e dos dígitos mostraram influxo de neutrófilos nas articulações nos 21º e 32º dias, respectivamente, após a CIA. Histologicamente, os joelhos e dígitos apresentaram diferentes níveis de infiltração leucocitária, mostrando que essas articulações são afetadas em diferentes períodos da inflamação. A migração neutrofílica foi acompanhada por aumento do número de mastócitos nos dígitos e intenso processo de desgranulação nos joelhos, no 21º dia após a CIA. Para avaliar os efeitos dessas células inflamatórias na CIA, os animais foram tratados com os fármacos prednisolona, comumente utilizado na clínica médica, ou nedocromil, estabilizador da membrana de mastócitos. Após a administração dos fármacos, a ocorrência da artrite não foi modificada, embora a migração neutrofílica tenha sido reduzida. O GC prednisolona causou aumento dos mastócitos nos tecidos articulares, enquanto a ação do nedocromil inibiu a proliferação e migração de neutrófilos, com efeitos potencialmente aumentados nos dígitos. A imunização com o colágeno bovino induziu o processo inflamatório caracterizado, principalmente, por ativação e desgranulação dos mastócitos, com consequente efeito na propagação do processo inflamatório e no recrutamento dos neutrófilos. Assim, o perfil inflamatório das células estudadas, nos dígitos e nos joelhos, sugeriu que o acometimento das articulações durante o desenvolvimento da CIA é tempo-dependente. Nos estudos relacionados com a artrite reumatóide (AR) humana investigamos a mobilização endógena da proteína Anx-A1 e do seu receptor para

peptídeos formilados tipo 1 (FPRL-1) nos linfócitos circulantes de pacientes em atividade ou em remissão. As análises ultraestruturais mostraram colocalização e alta expressão da Anx-A1 e do FPRL-1, principalmente no núcleo e citosol dos linfócitos de pacientes com AR em atividade, em relação aos remissivos. Esses dados sugerem que a Anx-A1 endógena é ativada durante a AR, podendo estar correlacionada com o receptor FPRL-1. Dessa forma, chegamos à conclusão de que o estudo dos tipos celulares envolvidos na artrite e a atividade que a proteína Anx-A1 pode exercer durante a evolução desta doença poderão definir o desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias baseadas no sistema Anx-A1.



# INTRODUÇÃO

---

---

A inflamação é uma resposta primordial que atua na proteção do hospedeiro contra a invasão de patógenos ou exposição a xenobióticos. No entanto, um processo inflamatório agressivo ou prolongado pode causar danos ao hospedeiro. Portanto, os organismos têm desenvolvido, evolutivamente, mecanismos que asseguram uma resposta inflamatória limitada em tempo e espaço (Boulay, Tardif *et al.*, 1990b; Perretti e D'acquistio, 2009). Esse conceito de que a inflamação é solucionada de maneira dependentes do tempo e do espaço está surgindo e diferentes resultados podem ser produzidos de acordo com o estágio ou a região na qual as vias ou os mediadores anti-inflamatórios se tornam funcionais (Serhan e Savill, 2005; Serhan, Brain *et al.*, 2007). Diversos mediadores anti-inflamatórios endógenos atuam na redução das propriedades dos fatores pró-inflamatórios, garantindo a resolução da inflamação.

A ação dos mediadores anti-inflamatórios e também daqueles que atuam em favor da resolução nos diferentes componentes da resposta inflamatória é crucial para a reestruturação do tecido e da homeostase. A elucidação da ação destes mediadores nas células imunes pode resultar na identificação de alvos moleculares, proporcionando o descobrimento de fármacos específicos para o tratamento de determinada condição inflamatória (Gonzalez-Rey, Chorny *et al.*, 2007; Serhan, Brain *et al.*, 2007). Atualmente, os glicocorticóides (GCs) são considerados a primeira classe de mediadores anti-inflamatórios endógenos amplamente utilizados para propósitos terapêuticos. Ressaltamos os medicamentos budesonida e beclometasona adotados para o tratamento da asma, e prednisolona no tratamento da artrite reumatóide (AR) e de outras doenças autoimunes.

A AR é uma doença autoimune, sistêmica, caracterizada por sinovite destrutiva crônica e por dor, podendo levar à perda da função (Pincus, 1995; Gonzalez, Maradit Kremers *et al.*, 2007). Diversos estudos em populações definidas estimam a prevalência de 0,5 a 1% em adultos (Macgregor, Bamber *et al.*, 1994; Symmons, Turner *et al.*, 2002; Helmick, Felson *et al.*, 2008). Os tratamentos com drogas modificadoras da doença (*Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs – DMARDs*) e GCs devem ser comumente utilizados, preferencialmente, na fase inicial da doença. Essas terapias têm o objetivo de reduzir a atividade e, se possível, alcançar a remissão (Moreland e O'dell, 2002).

Em indivíduos saudáveis, a liberação circadiana de GCs (tais como cortisol e corticosterona), a partir das glândulas adrenais, facilita o controle de diversos

processos homeostáticos cruciais para a saúde. Durante a inflamação, níveis elevados de cortisol diminuem os eventos inflamatórios locais e sistêmicos, facilitando, assim, a resolução apropriada das respostas inflamatórias (Sapolsky, Romero *et al.*, 2000; Rhen e Cidlowski, 2005). Essas funções patofisiológicas funcionais dos GCs são executadas por meio de diversos mecanismos moleculares, os quais podem ser amplamente divididos em genômicos (envolvendo transativação ou transrepressão da transcrição de um gene) e os não-genômicos (síntese rápida e “de novo” de uma proteína).

A anexina 1 (Anx-A1), uma proteína de 37kDa, formada por 346 aminoácidos, (também conhecida como lipocortina 1) tem sido descrita como um mediador endógeno regulador dos GCs (Perretti e D'acquistio, 2009). Estudos têm mostrado que os GCs regulam a síntese e função da Anx-A1 (Parente e Solito, 2004; Rhen e Cidlowski, 2005). Revisões recentes da literatura têm mostrado amplitude nos aspectos da biologia dessa proteína, que desempenha funções desde o sistema nervoso central (Solito, Mcarthur *et al.*, 2008) até o imune adaptativo (D'acquistio, Perretti *et al.*, 2008; Perretti e D'acquistio, 2009).

### **A superfamília da proteína anexina**

As anexinas (Anxs) foram descobertas há, aproximadamente, trinta anos. Uma análise filogenética de mais de cem diferentes espécies revelou a existência de, aproximadamente, quinhentos tipos de anexinas. Estas representam, pelo menos, cinquenta genes parálogos, classificados em cinco grupos familiares correspondentes aos reinos eucarióticos (Morgan e Fernández, 1995; Morgan, Jenkins *et al.*, 1999).

A Anx-A1, alvo principal de nosso estudo, foi identificada como “um polipeptídeo intracelular que tem a síntese e liberação estimulada por esteróides” e, inicialmente, nomeada de “macrocortina” (Blackwell, Carnuccio *et al.*, 1980). Estudos de diversos grupos de pesquisa relataram, ao mesmo tempo, o descobrimento de proteínas induzidas por GCs e com propriedades biológicas similares à macrocortina (inibição da atividade da fosfolipase A2 - PLA2), denominadas então de “renocorinas” (Rothhut, Cloix *et al.*, 1983) e “lipomodulinas” (Hirata, 1983). A colaboração dos três grupos de pesquisa mostrou – por meio de análises mais detalhadas do peso molecular, propriedades imunológicas, sequenciamento de

aminoácidos e cristalização da proteína – que aquelas proteínas recém descobertas eram altamente similares às anexinas, o que uniu a nomenclatura dessa família de macromoléculas (Rothhut, Russo-Marie *et al.*, 1983). Assim, o nome anexina (Anx), derivado do grego *annex*, foi proposto para descrever as principais propriedades de todas, ou quase todas, as anexinas (Gerke e Moss, 2002).

Os treze membros de Anxs, comuns aos vertebrados, foram recentemente classificados na família anexina A e nomeados como anexina A1-13 (ou Anx-A1; Anx-A13), sendo a A12 excluída da nomenclatura oficial (de acordo com a base de dados *HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute*, disponível para acesso no endereço eletrônico <http://www.genenames.org>). Ainda, as Anxs são classificadas como família B, nos invertebrados; C, nos fungos e em alguns grupos de eucariotos unicelulares; D, nas plantas, e E, nos protistas, com pelo menos 40 famílias adicionais aguardando a classificação (Moss e Morgan, 2004).

A primeira descrita como uma proteína isolada e purificada foi a anexina 7 (Creutz, Pazoles *et al.*, 1978), e as primeiras clonadas foram as anexinas A1 e A2 humanas (Huang, Wallner *et al.*, 1986; Saris, Tack *et al.*, 1986).

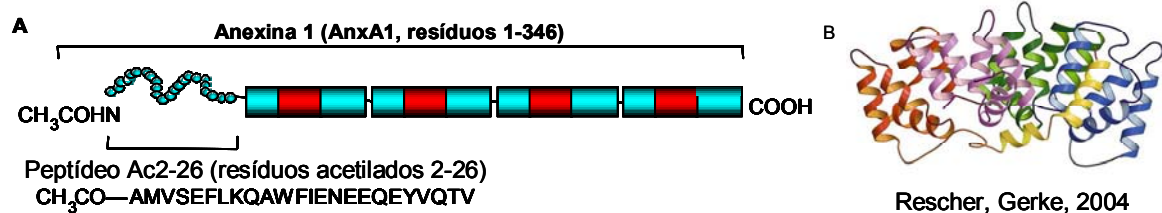
### **Anexina 1**

A Anx-A1, conhecida inicialmente como lipocortina 1, é o primeiro de treze membros da “Família Anexina”, justamente agrupadas em função das similaridades estruturais, incluindo a presença de sequências específicas para a ligação de cálcio (Gerke e Moss, 2002; Gerke, Creutz *et al.*, 2005). Esta proteína é amplamente distribuída no organismo, sendo particularmente abundante nas células inflamatórias e epiteliais (Dreier, Schmid *et al.*, 1998; Oliani e Perretti, 2001; Damazo, Yona *et al.*, 2005).

A Anx-A1 é a mais estudada entre as proteínas da família das Anxs, por desempenhar funções importantes no crescimento (De Coupade, Gillet *et al.*, 2000) e na diferenciação celular (Flower e Rothwell, 1994), no tráfego de vesículas intracelulares (Gerke e Moss, 2002), na regulação do processo inflamatório (Perretti, 2003), na apoptose (Solito, Kamal *et al.*, 2003) e na liberação do ácido araquidônico (Croxtall, Choudhury *et al.*, 2000).

Todas as Anxs consistem de um *core*, constituído de quatro repetições de 60-

70 aminoácidos cada, ligados a uma única região N-terminal. O *core* representa a maior parte da proteína ( $\geq 80\%$ ), enquanto a região N-terminal confere especificidade de ação para cada membro da superfamília das Anxs (Gerke, Creutz *et al.*, 2005; Perretti e Dalli, 2009). A Anx-A1 é caracterizada por um domínio N-terminal único que contém a atividade biológica inteira da proteína e outro C-terminal, que compreende o *core* da proteína. Este consiste de quatro repetições homólogas, com cinco  $\alpha$ -hélices cada. Dois sítios de ligação com o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) são expressos na região convexa de cada repetição. A região convexa faz face à membrana celular, enquanto a região côncava, com o domínio N-terminal, permanece livre para interagir com as proteínas citosólicas (Rescher e Gerke, 2004). Uma representação esquemática da estrutura primária e o arranjo tridimensional da Anx-A1 são mostrados na figura 1.



**Figura 1 - (A)** Estrutura primária da proteína anexina 1, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26). **(B)** Ilustração do arranjo tridimensional desta proteína.

Uma importante característica da Anx-A1, que também é compartilhada pelos outros membros da família, é a habilidade para alterar a conformação durante a ligação dos cátions de cálcio (Rosengarth, Gerke *et al.*, 2001; Rosengarth, Rösger *et al.*, 2001; Gerke, Creutz *et al.*, 2005). Na presença de concentrações de cálcio  $\geq 1\text{mM}$  (presente no plasma ou outros fluidos biológicos), a Anx-A1 é reestruturada, permitindo uma ligação fosfolipídica, em particular aos ácidos fosfolipídicos (Rosengarth, Gerke *et al.*, 2001; Rosengarth, Rösger *et al.*, 2001). A interação com os fosfolípeos por meio das regiões do *core*, mantidas por sequências cálcio-ligantes, ocorre concomitantemente ao rearranjo da região N-terminal e, assim, os aminoácidos ali presentes são expostos ao ambiente extracelular (Rosengarth, Gerke *et al.*, 2001).

O gene *Anx-A1*, em humanos, está localizado na região cromossômica 9q12-9q21.2 (Huebner, Cannizzaro *et al.*, 1988). A expressão da proteína transcrita por

este gene pode ocorrer em células diferenciadas após estímulo de GCs (Solito, Rauegi *et al.*, 1991). No entanto, algumas citocinas, tais como a interleucina (IL)-6, induzem a ativação do gene *Anx-A1* mesmo na ausência do GC dexametasona (Solito, De Coupade *et al.*, 1998b). Da mesma forma, nas fases iniciais do modelo de inflamação granulomatosa em camundongos, a produção de RNAm para *Anx-A1* foi observada na ausência de alta produção de corticosterona no plasma (Gibbs, Carollo *et al.*, 2002). Ainda, diversos mecanismos regulatórios atuam na expressão gênica da *Anx-A1* em vertebrados, podendo inclusive ser mediada por fatores convencionais ligantes de CAAT e TATA-box (Donnelly e Moss, 1998). Tal diversidade pode explicar a expressão diferenciada desta proteína em diversos tipos celulares e teciduais.

A *Anx-A1* é amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada nos leucócitos circulantes, células estromais e fluidos biológicos. No sangue periférico, os granulócitos e monócitos são as maiores fontes de *Anx-A1*, sendo os neutrófilos as principais células entre os granulócitos (Perretti e Flower, 1996; Oliani, Damazo *et al.*, 2002). Estudos da expressão desta proteína também demonstraram alta síntese nas células inflamatórias como os eosinófilos (Oliani, Damazo *et al.*, 2002) e mastócitos (Oliani, Christian *et al.*, 2000; Silistino-Souza, Rodrigues-Lisoni *et al.*, 2007; Oliani, Ciocca *et al.*, 2008). Diferentemente, os linfócitos apresentam expressão reduzida de *Anx-A1* (Kamal, Flower *et al.*, 2005) e os linfócitos B humanos não expressam esta proteína (Morand, Hutchinson *et al.*, 1995; D'acquisto, Merghani *et al.*, 2007; Perretti e D'acquisto, 2009).

Além das células inflamatórias, as células epiteliais são as principais fontes de *Anx-A1* nos pulmões, intestinos e rins (Vervoordeldonk, Schalkwijk *et al.*, 1994; Solito, De Coupade *et al.*, 1998a; Babbin, Lee *et al.*, 2006), assim como as estromais, como os fibroblastos (Goulding, Pan *et al.*, 1996; Solito, De Coupade *et al.*, 1998a; Dasuri, Antonovici *et al.*, 2004; Tagoe, Marjanovic *et al.*, 2008). Em termos gerais, as células completamente diferenciadas apresentam, normalmente, positividade em níveis elevados de *Anx-A1*. Além disso, a diferenciação celular (e, em alguns casos, a ativação celular) é o maior estímulo para a síntese e regulação de *Anx-A1*, sendo este processo ainda pouco entendido.

A *Anx-A1* apresenta atividade na regulação da adesão dos neutrófilos (Perretti, 1997; Oliani, Paul-Clark *et al.*, 2001; Gil, La *et al.*, 2006) e monócitos (Solito, De Coupade *et al.*, 2001) às células endoteliais ativadas. Uma vez na superfície celular,

a Anx-A1 pode atuar por meio de mecanismos autócrinos ou parácrinos com a finalidade de inibir a ativação celular e o processo de diapedese (Perretti, Croxtall *et al.*, 1996; Perretti e Flower, 2004), possivelmente por uma interação com os receptores para peptídeos formilados (FPRs) (Gavins, Yona *et al.*, 2003; Hayhoe, Kamal *et al.*, 2006).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa mostrou que, além das células, o sangue periférico de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral expressa Anx-A1 em quantidades reduzidas nos níveis de mRNA (Faria, Sena *et al.*, 2009).

### **Anexina 1 e seus receptores para peptídeos formilados (FPRs)**

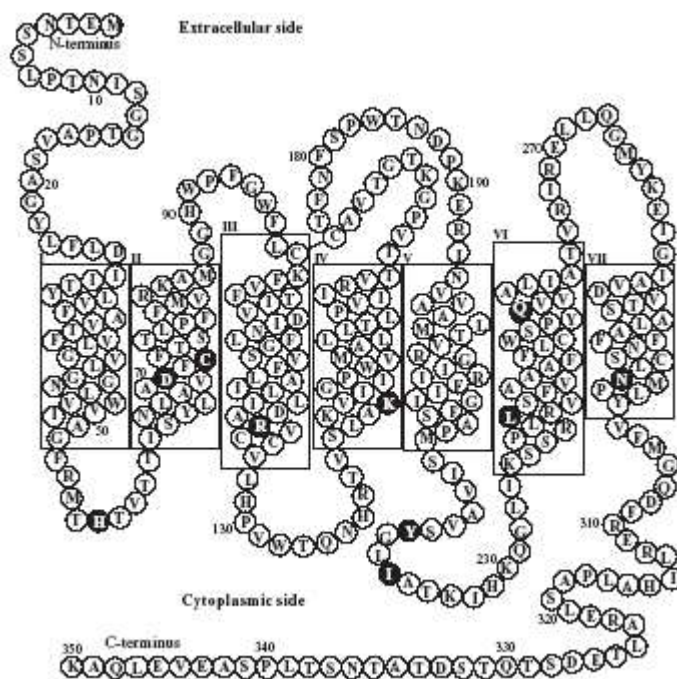
Originalmente descrita como inibidor da fosfolipase A2 (Flower e Blackwell, 1979) com consequente efeito inibitório na geração de prostaglandinas e leucotrienos (Cirino e Flower, 1987; Flower, 1988; Goulding, Pan *et al.*, 1996), a identificação de sítios ligantes para a Anx-A1 em neutrófilos e monócitos periféricos (Goulding, Luying *et al.*, 1990; Goulding e Guyre, 1992; Goulding, Pan *et al.*, 1996), bem como nas células endoteliais (Srikrishna, Panneerselvam *et al.*, 2001) e linhagens celulares U937 (Solito, Romero *et al.*, 2000), indicou a existência de receptor (es) para a Anx-A1.

A existência dos receptores para a Anx-A1 foi comprovada, quando o uso da proteína, ou do seu peptídeo, produziu uma resposta em neutrófilos humanos tratados com antagonistas de receptores para peptídeos formilados (FPR), denominado Boc (grupo terc-butiloxicarbonilo, usado para proteger a região N-terminal de uma sequência de aminoácidos durante a síntese de peptídeos) (Dalpiaz, Scatturin *et al.*, 2001; Paclet, Davis *et al.*, 2004).

O FPR é um protótipo de um grupo de receptores acoplados à proteína transmembrana G, clonado em meados da década de 80 (Boulay, Tardif *et al.*, 1990a; b; Becker, Forouhar *et al.*, 1998).

No sistema humano, foram descritos três receptores, o FPR like-1 (FPRL-1) e o FPRL-2, estruturalmente relacionados ao FPR, mas que apresentam distinções com relação ao tipo de ligante (Le, Murphy *et al.*, 2002). Nos murinos, foram relatados oito genes para esses receptores, dos quais somente três (Fpr, Fpr-rs1 e Fpr-rs2) são traduzidos em proteína (Gao, Chen *et al.*, 1998). Os três genes de receptores

humanos estão no cromossomo 19 e os oito genes dos receptores murinos estão agrupados no cromossomo 17. O gene murino Fpr-rs1 parece codificar o receptor para lipoxina A4 (ALXR) (Takano, Fiore *et al.*, 1997), ao passo que o gene Fpr-rs2 é similar para os genes humanos FPRL-1 e FPRL-2 (Le, Murphy *et al.*, 2002). Um modelo da estrutura secundária do receptor FPR é mostrado na figura 2.



**Figura 2** - Representação esquemática da estrutura secundária do receptor FPR (Gripentrog e Miettinen, 2005).

Walther e colaboradores (2000) demonstraram, em experimentos com neutrófilos e células endoteliais *in vitro*, uma interação direta entre o peptídeo Ac2-26 e o receptor FPR (Walther, Riehemann *et al.*, 2000). Estudos subsequentes também revelaram que, após a adesão dos neutrófilos à monocamada endotelial, a Anx-A1 endógena foi imunoprecipitada com o receptor FPRL-1 (Perretti, Chiang *et al.*, 2002). Este receptor também foi ativado por outro mediador anti-inflamatório endógeno, denominado lipoxina A4 (Anx-A1 e lipoxina A4 competem pelo mesmo receptor). Estes dados geraram, então, a hipótese de que pelo menos dois efetores endógenos anti-inflamatórios poderiam utilizar do mesmo receptor acoplados à proteína transmembrana G (Perretti, Chiang *et al.*, 2002; Gilroy e Perretti, 2005).

Diversas investigações têm sido realizadas e demonstram a complexidade do estudo dos FPRs. Entre estes estudos, uma importante descoberta mostrou que os



peptídeos derivados da proteína Anx-A1 ativaram todos os três membros da família de receptores FPR humanos (Rescher, Danielczyk *et al.*, 2002; Ernst, Lange *et al.*, 2004; Karlsson, Fu *et al.*, 2005), enquanto a proteína em sua sequência inteira se ligou, apenas, ao FPRL-1, mas não ao FPR (Hayhoe, Kamal *et al.*, 2006). Dessa maneira, os resultados indicaram que o FPRL-1 pode ser o responsável pela transdução dos sinais inibitórios da Anx-A1 na patofisiologia da inflamação, sugerindo mais uma via possível de estudos para o desenvolvimentos de drogas anti-inflamatórias (Perretti e Dalli, 2009).

Após as análises com neutrófilos humanos, a interação da Anx-A1 endógena com o receptor próprio também foi confirmada no nosso laboratório por estudos imunocitoquímicos ultra-estruturais, no mesentério de camundongos (Gastardelo, Damazo *et al.*, 2009). Além disso, o uso de animais deficientes para o receptor Fpr murino (Perretti, Getting *et al.*, 2001) demonstrou que, na ausência do ortólogo murino do FPR humano, a maioria das propriedades antimigratórias do peptídeo acetil-2-26 (Ac2-26), derivado da Anx-A1, foi perdida, quando utilizado o modelo de peritonite em camundongos. Em contraste, uma maior proporção dos efeitos inibitórios da Anx-A1 recombinante humana (hr-Anx-A1) foi mantida. Estes dados indicaram que as observações obtidas para o FPR e o FPRL-1 humano, em termos de dicotomia em relação às habilidades de ligação à Anx-A1 e seus peptídeos (Hayhoe, Kamal *et al.*, 2006), haviam sido previamente sugeridas no sistema murino.

Entre as células que expressam receptores da família do FPR, foi descrito, até o momento, que os neutrófilos (Gastardelo, Damazo *et al.*, 2009) e fibroblastos (Migeotte, Communi *et al.*, 2006) apresentam os receptores FPR e FPRL-1, enquanto os linfócitos T, apenas o FPRL-1 na membrana plasmática (Ye, Boulay *et al.*, 2009). No entanto, não há dados na literatura que indiquem ou excluam a existência de outros tipos de FPR nesses tipos celulares.

### **Expressão da anexina 1 nos processos inflamatórios**

Diversas ferramentas têm sido utilizadas no estudo do papel da Anx-A1 no funcionamento do sistema imune. Anticorpos neutralizadores (Perretti, Ahluwalia *et al.*, 1996), agentes antisense (Croxtall e Flower, 1994), proteínas normais e quiméricas (Lim, Solito *et al.*, 1998) e peptídeos miméticos (Perretti, Getting *et al.*, 2001) são técnicas amplamente aplicadas. As linhagens transgênicas deficientes