

Proteína antiinflamatória anexina 1: mecanismos celulares e relevância clínica

Anti-inflammatory protein annexin 1: cellular mechanisms and clinical relevance

Sonia M. Oliani¹; Cristiane D. Gil²

¹Professora Livre Docente do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto - SP; Professora Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Morfologia, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo - SP;

²Professora Doutora do Departamento de Anatomia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto – SP.

Resumo Um dos eventos de importância no processo inflamatório é o recrutamento dos leucócitos da circulação sanguínea para os sítios da inflamação por meio de interações com as células endoteliais das vênulas pós-capilares. O mecanismo de recrutamento é desencadeado por uma série de mediadores pró-inflamatórios que são produzidos por células como mastócitos, macrófagos, células endoteliais ativadas, bem como leucócitos transmigrações para o tecido inflamado. Por outro lado, a resposta inflamatória é controlada pela ação de mediadores antiinflamatórios que atuam para manter a homeostasia da resposta imunológica e prevenir a lesão tecidual. Entre esses mediadores destaca-se a anexina 1, primeiro membro descrito de uma família de proteínas ligantes de fosfolipídios dependentes de cálcio, com seqüências de aminoácidos altamente conservadas nos vertebrados. Esta proteína atua como um potente modulador endógeno da inflamação, inibindo a atividade de enzimas que atuam na produção de mediadores pró-inflamatórios e interferindo no processo de transmigração dos leucócitos. Nesta revisão, a estrutura, a expressão, os mecanismos de ação e os efeitos farmacológicos da anexina 1 em diferentes modelos experimentais são abordados. O objetivo final das investigações é avaliar a adequação do uso da anexina 1 como um agente terapêutico eficaz no tratamento de patologias causadas pela inflamação, como a artrite reumatóide, lesão do miocárdio por isquemia-reperusão, neoplasias e asma, por exemplo.

Palavras-chave Anexina A1; Inflamação; Leucócitos; Células Endoteliais; Mastócitos; Macrófagos.

Abstract An important step of the inflammatory process is the recruitment of leukocytes from the circulation to sites of inflammation through interaction with post-capillary venule endothelial cells. The mechanism of recruitment is enhanced by a series of pro-inflammatory mediators that are produced and released into the tissue by mast cells, macrophages, activated endothelial cells, as well as transmigrated leukocytes. On the other hand, the inflammatory response is controlled by the action of anti-inflammatory mediators that act to maintain homeostasis of the immunological response and to prevent tissue injuries. Among these mediators, annexin 1, the first characterized member of a family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins with a highly preserved amino acid sequence in vertebrates has emerged as an anti-inflammatory mediator. This protein acts to inhibit enzymatic activity and hence the production of proinflammatory mediators and counteracts the process of leukocyte extravasation. In this review we describe the expression, mechanisms of action and pharmacological effects of this protein in different experimental models. The final objective of investigations is to test annexin 1 as an innovative drug that may be effective in the treatment of inflammatory pathologies, such as rheumatoid arthritis, ischemia-reperfusion-induced myocardial injury, neoplasias, and asthma.

Keywords Annexin A1; Inflammation; Leukocytes; Endothelial Cells; Mast Cells; Macrophages.

Introdução

No processo inflamatório, a ação dos mediadores farmacológicos incluindo aminas vasoativas, eicosanóides, produtos do complemento (C5a), citocinas quimiotáticas como a interleucina-8 (IL-8), em resposta ao tecido lesado ou inflamação resulta na quimiotaxia e na migração de leucócitos. A liberação desses mediadores pró-inflamatórios induz a mudanças rápidas e severas nas propriedades de adesão das células endoteliais, causando um aumento da adesão entre os leucócitos e o endotélio¹.

O recrutamento de leucócitos do sangue para o tecido envolve um contato inicial com o endotélio vascular, sendo este um

processo mediado por moléculas de adesão específicas, presentes nos leucócitos e nas células endoteliais, por exemplo, as integrinas (principalmente b1 e b2), moléculas de adesão intercelular (ICAM-1,2,3), de adesão celular vascular (VCAM-1) e de adesão celular plaqueta-endotélio (PECAM-1)².

O processo de extravasamento dos leucócitos através do endotélio não é totalmente entendido e os modelos de adesão leucócito-endotélio, *in vitro*, podem não reproduzir adequadamente o complexo cenário observado *in vivo*. O estabelecimento da técnica de microscopia intravital permite o monitoramento e a quantificação de interações entre diferentes

células e o endotélio vascular. Esse evento ocorre em cascata, de modo que moléculas de adesão como as selectinas (L, P e E-selectinas) são envolvidas fortemente na captura e rolamento dos leucócitos².

Em vista da produção e da liberação de várias enzimas e radicais tóxicos que podem ocorrer com a migração dos leucócitos no tecido, o tempo de dependência da inflamação é crucial para a sobrevivência e resolução do processo. A movimentação dos leucócitos é regulada e os caminhos endógenos existem para assegurar o tempo que é dependente do processo. Particularmente, nessa fase da resposta imunológica, a proteína anexina 1 é fortemente apontada como um potente mediador antiinflamatório.

Anexina 1: estrutura e função

A anexina 1 (ANXA1) foi o primeiro membro clonado de uma superfamília de proteínas estruturalmente relacionadas, denominadas anexinas, que se ligam aos fosfolipídios de uma forma dependente de cálcio³. Inicialmente essa proteína foi denominada lipocortina pelo fato de mimetizar a ação antiinflamatória dos glicocorticóides afetando muitos componentes da reação inflamatória e a liberação do ácido araquidônico^{4,5}. Os genes dos doze membros dessa família foram descritos e clonados em humanos^{6,7} e estão dispersos pelo genoma nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 e 15⁸. O gene da ANXA1 humana está localizado no cromossomo 9 (posição 9q12-21.2) e codifica uma proteína de 37 kDa⁹. A organização dos treze exons e íntrons dos genes da ANXA1 em vertebrados é altamente conservada¹⁰.

Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios: uma pequena região N-terminal, variando em comprimento e composição⁶, e um domínio central, C-terminal, formado por quatro ou, como na anexina 6, por oito dobras repetidas de uma seqüência conservada de 70-80 aminoácidos¹¹. O domínio N-terminal é específico para cada membro da família de anexinas e interage com os diferentes ligantes destas proteínas, enquanto a região C-terminal conservada é responsável pela afinidade ao cálcio e conseqüente ligação aos fosfolipídios. Uma representação esquemática da estrutura primária da ANXA1 é mostrada na figura 1.

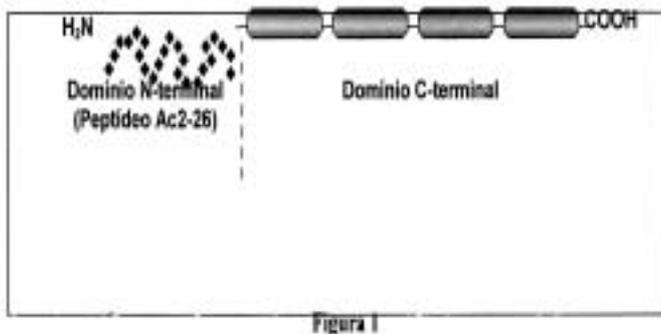


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura primária da proteína antiinflamatória Anexina 1. O domínio C-terminal é constituído por quatro seqüências de aminoácidos repetidas, representadas pelos números de I a IV, e responsável pela afinidade da proteína ao cálcio. A região N-terminal é constituída por 44 aminoácidos e tem sido caracterizada como promotora da ação antiinflamatória da proteína.

Em decorrência da afinidade com fosfolipídios, as anexinas atuam como pontes de ligação entre membranas e entre a membrana e o citoesqueleto. Além disso, já foram descritas outras atividades para essas proteínas, sobretudo envolvendo mecanismos de anticoagulação, exocitose, endocitose, eventos de fusão de membrana, diferenciação celular, controle do crescimento celular, transdução de sinal e formação do citoesqueleto^{3,6}.

A síntese da proteína ANXA1 é controlada parcialmente por hormônios glicocorticóides e a sua concentração pode ser elevada no homem ou em animais de laboratório por administração única ou repetida de hidrocortisona ou dexametasona¹². Da mesma forma, o RNAm da ANXA1 é negativamente regulado por adrenalectomia ou por tratamento com antagonistas de glicocorticoide (GC)¹³. Diversos estudos mostram síntese aumentada dessa proteína em diferentes tipos celulares incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e mastócitos¹⁴⁻¹⁷ em resposta ao tratamento com GC.

Anexina 1: expressão e função nas células envolvidas no processo inflamatório

A expressão e a distribuição da proteína ANXA1 são investigadas em vários órgãos sob condições experimentais de inflamação aguda e crônica. Na inflamação granulomatosa crônica, induzida na pele de camundongos com uma mistura de óleo de cróton e adjuvante de Freund, os níveis de ANXA1 mudaram significativamente nas quatro semanas de estudo¹⁸. Um pico inicial na expressão desta proteína foi observado no sétimo dia (com influxo máximo de neutrófilos) e outro, subseqüentemente, no vigésimo oitavo dia (envolvendo principalmente macrófagos e neutrófilos). Esse modelo de expressão indicou que os neutrófilos infiltrados são responsáveis pela maioria da ANXA1 presentes no modelo de inflamação granulomatosa tanto no estágio agudo como durante o processo de resolução.

Entre os leucócitos, a ANXA1 é expressa predominantemente nos neutrófilos, eosinófilos e monócitos e mais discretamente nos linfócitos^{19,20}. Os neutrófilos humanos quando são ricos em níveis de ANXA1 (aproximadamente 1-2% do total de proteínas citosólicas), podem externalizar grande quantidade de proteína (>50%) em adesão à monocamada de células endoteliais²¹⁻²³. Os níveis de ANXA1 são aumentados nos leucócitos em resposta à injeção de glicocorticoide como observado em voluntários humanos. Citocinas, tais como fator de necrose tumoral, IL-1 e -6 podem também aumentar a expressão da ANXA1 celular e tecidual⁵. A ANXA1, exposta sobre a membrana plasmática do leucócito aderente, exerce uma ação inibitória, reduzindo a extensão da transmigração através das células endoteliais^{22,24}. Essas observações, in vitro, são confirmadas por uma série de estudos in vivo, em que a ANXA1 e seus miméticos (peptídeos extraídos da região N-terminal da ANXA1) podem retardar o processo de extravasamento de leucócitos como visualizado pela microscopia intravital²⁵. Investigações usando um clássico modelo de peritonite em ratos demonstraram que a ANXA1 intacta é predominantemente encontrada na membrana plasmática dos neutrófilos intravasculares aderidos ao endotélio¹⁴. Uma vez no espaço extravascular, a maior parte da proteína contida nos neutrófilos é clivada na região N-terminal. Essa região é caracterizada como promotora da ação antiinflamatória da ANXA1, sendo que os resultados experimentais com o peptídeo sintético contendo a mesma seqüência de aminoácidos, denominado Ac2-26, confirmam a presença desse sítio ativo^{5,26}. A Figura 2 mostra o modelo da mobilização da proteína proposto durante o processo de transmigração do neutrófilo.

Além dos leucócitos, outras células importantes na inflamação, como os mastócitos e as células endoteliais, expressam a ANXA1^{14,15,23}. Nos mastócitos – células localizadas nas regiões perivasculares e residentes no tecido conectivo – a expressão desta proteína é modulada pela ação de GC como demonstrado em ratos tratados com dexametasona¹⁵. Neste estudo também foi detectado um aumento na síntese do RNAm da ANXA1 nos mastócitos após reação inflamatória provocada pela administração da carragenina. É interessante destacar que, os dois subtipos de mastócitos, de mucosa e de tecido conjuntivo, apresentam diferentes graus de expressão e de susceptibilidade na modulação da ANXA1 após estímulo alérgico²⁷. Um dos papéis da ANXA1 exógena nos mastócitos foi relacionado com a inibição da liberação de histamina por estas células²⁸. Em consequência da localização estratégica dos mastócitos junto aos vasos sanguíneos e de sua função de iniciar e resolver o processo inflamatório²⁹, mais estudos serão necessários para se estabelecer o papel da ANXA1 nesse tipo celular. As células endoteliais expressam ANXA1 no núcleo, no citoplasma^{14,23,30} e, particularmente, na membrana plasmática após interação com neutrófilos^{14,23}. Estudos em ratos, utilizando um clássico modelo de peritonite pela administração da carragenina, demonstraram que os níveis da ANXA1 nas células endoteliais das vénulas pós-capilares do mesentério aumentaram após o processo de diapedese dos neutrófilos¹⁴. Os estudos sobre o padrão de expressão da ANXA1 e sua modulação pela ação de GC ou na resposta inflamatória demonstram a importância de se investigar novos aspectos da distribuição e da localização dessa proteína em células residentes e ativadas, aspectos estes que começam ser revelados.

Mecanismo de ação da ANXA1

A resposta inflamatória, como já citado, é regulada pela ação de mediadores farmacológicos produzidos e secretados por células, como mastócitos, macrófagos, células endoteliais e leucócitos. Dentre os mediadores, destacam-se os metabólitos do ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos, gerados pela atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA₂), os quais induzem mudanças rápidas e severas nas propriedades de adesão das células endoteliais, causando um aumento da adesão entre os leucócitos e o endotélio¹.

A atividade da PLA₂ é um dos alvos sugeridos da ação antiinflamatória da ANXA1. Estudos utilizando peptídeos mutantes gerados por deleções na seqüência de aminoácidos da ANXA1, demonstraram a inibição da atividade da PLA₂ tanto pela proteína intacta quanto pela região C-terminal³¹. No entanto, essa inibição não ocorre pelo domínio N-terminal. A relação entre a ANXA1 endógena e a PLA₂ foi confirmada por investigações realizadas com a linhagem de monócitos U-937 transfectados com o cDNA sense e antisense para a ANXA1³². As células transfectadas com o clone antisense apresentaram uma alta atividade da PLA₂ e baixa expressão da ANXA1 comparadas àquelas transfectadas com o clone sense. Além disso, camundongos nocautes para a ANXA1 apresentam um aumento no nível do RNAm e da proteína PLA₂³³. Esses dados sugerem que a expressão da ANXA1 endógena regula a expressão e a atividade desta enzima.

Outra enzima que parece ser alvo da ação inibitória da ANXA1 é a sintase de óxido nítrico induzida (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO) nos leucócitos ativados para exercerem sua atividade microbicida³⁴. O papel inibitório da ANXA1 sobre a iNOS foi demonstrado em um modelo experimental de choque séptico em ratos induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS)³⁵. Os investigadores observaram que o pré-tratamento dos animais com o anticorpo policlonal anti-ANXA1, associado ao fármaco dexametasona, preveniu os efeitos hemodinâmicos benéficos assim como a atividade da iNOS desencadeados pelo GC nos animais. Além disso, a dexametasona ou a proteína ANXA1 recombinante humana impediram a indução da iNOS em macrófagos murinos (linhagem J774.2) ativados com LPS, efeito este, anulado pelo pré-tratamento das células com anticorpo anti-ANXA1.

Além do exposto, um dos principais papéis antiinflamatórios relatados na literatura para a ANXA1 está relacionado com a transmigração dos leucócitos. Esse efeito pode ser exercido tanto pela ANXA1 intacta, quanto pelos peptídeos gerados da porção N-terminal desta proteína, particularmente o Ac2-26^{36,37}. Estudos recentes demonstraram que o efeito protetor da ANXA1 e de seus miméticos reduzem o dano no miocárdio dependente da transmigração de leucócitos associado com o processo isquêmico por reperfusão (modelo experimental em ratos)^{36,37}. A fim de entender o mecanismo do efeito protetor da ANXA1, no modelo isquemia/reperfusão (IR), foi examinada a região dos aminoácidos da ANXA1 que retém esse efeito, além das mudanças na ANXA1 endógena em relação ao dano induzido pela IR e após modulação farmacológica³⁷. Os dados obtidos mostraram que o peptídeo protegia contra a lesão IR e estava relacionado com a redução da atividade da mieloperoxidase e com os níveis de IL-1b no coração infartado. A administração de Ac2-26, durante 30 e 60 minutos pós-reperfusão, ainda produzia uma significativa proteção contra a lesão IR, indicando o potencial para a aplicação clínica. Análises de western blotting e microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o coração IR aumentava a expressão de ANXA1 no tecido lesado, principalmente em associação com o infiltrado leucocitário.

Também foi investigado o potencial envolvimento de receptores na ação protetora da ANXA1. Esta proteína e o seu peptídeo Ac2-26 N-terminal interagem diretamente com dois receptores ligados à proteína G, receptor de formil peptídeo (FPR) e receptor de lipoxina A4 (ALX/FPRL1), para interromper a diapedese dos neutrófilos³⁸. O peptídeo N-terminal da ANXA1 ao se ligar ao FPR desencadeia alterações na concentração de cálcio sem ativar a via da MAP quinase³⁹. Isto causou uma inibição específica da migração transendotelial dos neutrófilos humanos e a dessensibilização destas células aos quimioattractantes, evitando dessa forma sua ativação. Estudos utilizando um modelo de IR, em camundongos nocautes para os receptores FPR, demonstraram o efeito protetor do peptídeo N-terminal da ANXA1 no miocárdio após o tratamento farmacológico⁴⁰. Também foi sugerido o envolvimento de outro receptor para o modelo murino utilizado, o receptor de lipoxina A4, que atua no controle excessivo da infiltração de neutrófilos e limita a resposta inflamatória^{40,41}.

Na maioria, se não em todas as condições experimentais, a ANXA1 parece atuar como um mediador de efeito protetor exibido pelos GCs, por exemplo, dexametasona, visto que os anticorpos anti-ANXA1 previnem a inibição proporcionada por esteróides³⁶. Esses dados não somente forneceram uma nova visão para o efeito protetor da proteína ANXA1 e seus miméticos, como também geraram fundamentos para o desenvolvimento de drogas de uso clínico nessa linha de pesquisa.

Mecanismos da ação antimigratória da ANXA1

O processo de extravasamento leucocitário é crucial para a sobrevivência do hospedeiro frente a um estímulo inflamatório ou infeccioso. O tráfego de leucócitos é minuciosamente regulado pela ação de mediadores pró e antiinflamatórios que operam para promover e controlar o extravasamento dessas células evitando assim, uma exacerbação da resposta inflamatória.

Vários estudos farmacológicos demonstraram que a ANXA1 inibe o extravasamento dos leucócitos em modelos de inflamação aguda⁴² e crônica⁴³, assim como em modelos de inflamação sistêmica⁴⁴. Esses modelos in vivo associados às investigações de ANXA1 em neutrófilos humanos, mostraram que em neutrófilos não ativados, a ANXA1 está amplamente localizada no citosol²¹, mas pode ser rapidamente mobilizada para a superfície quando os neutrófilos aderem ao endotélio⁴⁵. Uma vez na membrana plasmática, a ANXA1 atua de uma forma autócrina/parácrina para reduzir o extravasamento celular.

Um provável mecanismo de ação da ANXA1 na regulação da migração celular é interferir na atividade das moléculas de adesão relacionadas com as interações leucócito-endotélio, principalmente as integrinas e as selectinas.

As integrinas estão envolvidas em diversas funções dos leucócitos, principalmente na migração, na desgranulação e na locomoção desses tipos celulares na matriz extracelular⁴⁶. O preenchimento e o agrupamento do receptor de integrina (ligando e ativando as integrinas adjacentes sobre a superfície celular) resultam na formação de adesão focal e ligação de integrinas ao complexo citoesqueleto intracelular e feixes de filamentos de actina. Esse fato resulta na mudança da forma, na ativação celular e na locomoção dos leucócitos⁴⁶.

Utilizando a técnica de microscopia confocal, pesquisadores observaram a co-localização da ANXA1 com a integrina $\alpha_4\beta_1$ na superfície de monócitos da linhagem U-937⁴⁷. Sabe-se que esta integrina interage com a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) expressa pelas células endoteliais para mediar os processos de rolamento e adesão firme dos neutrófilos⁴⁸. Nesse contexto, estudos de co-immunoprecipitação demonstraram que a ANXA1 e a VCAM-1 competem pela ligação à integrina $\alpha_4\beta_1$ nas células U-937⁴⁷.

Um outro efeito da ANXA1 sobre as moléculas de adesão seria induzir a quebra da L-selectina (CD26L)⁴⁹, responsável pelo contato inicial entre os leucócitos e o endotélio. Outras investigações sugeriram que a exposição da ANXA1 endógena na superfície dos monócitos (linhagem U-937), induzida por glicocorticóides, facilitaria a quebra da L-selectina através de uma interação com esta molécula dependente de cálcio⁵⁰.

Estudos recentes demonstraram diferentes mecanismos de ação para a proteína ANXA1 intacta e seu peptídeo N-terminal Ac2-26 no recrutamento leucocitário in vitro⁵¹. Os pesquisadores verificaram que a proteína intacta inibiu a adesão firme dos leucócitos humanos ao endotélio, enquanto o peptídeo atenuou

os processos de captura e rolamento destas células. Além disso, a proteína e o seu peptídeo demonstraram diferentes efeitos sobre as moléculas de adesão, com esses resultados evidenciando que somente o peptídeo causou a quebra da L-selectina e interação com os receptores da família FPR.

Essas investigações mostram que os efeitos da ANXA1 e de seus miméticos, sobre as moléculas de adesão, contribuem para a sua ação inibitória na adesão leucócito-endotélio.

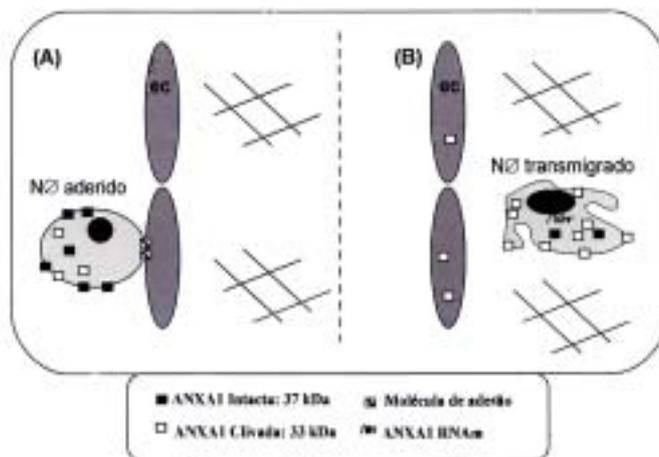


Figura 2

Figura 2 – Mobilização e a clivagem da proteína ANXA1 na transmigração dos neutrófilos durante o processo inflamatório. Os neutrófilos circulantes possuem em seu citosol, principalmente, ANXA1 intacta (37 kDa). **(A)** A adesão do neutrófilo ao endotélio externaliza a proteína na membrana plasmática e um processo de clivagem pode ocorrer separando a região N-terminal¹⁴. **(B)** Após o processo de diapedese, os neutrófilos e as células endoteliais apresentam um aumento na expressão da ANXA1 clivada (33 kDa), com uma predominante localização intracelular nos NØs. O contato do neutrófilo com as proteínas da matriz extracelular leva à síntese de novo da ANXA1 (ANXA1 RNAm). NØ = neutrófilo; ec = célula endotelial.

Animais nocautes para a ANXA1 na resposta inflamatória

O desenvolvimento recente da linhagem de camundongos deficientes para o gene da Anx1 (ANXA1 null) permite o melhor entendimento da proteína ANXA1 endógena em diversos aspectos da biologia da célula³³ e no processo inflamatório⁴⁴. Em modelos de inflamação, induzidos pela carragenina ou zymosan, os animais ANXA1 null exibiram uma resposta exacerbada aos estímulos inflamatórios caracterizada por um aumento na migração dos leucócitos e na síntese de IL-1b. Além disto, apresentaram uma resistência parcial ou completa aos efeitos antiinflamatórios dos GCs³³. Os leucócitos polimorfonucleares aumentaram sua capacidade de migração in vivo e in vitro, enquanto os macrófagos demonstraram falhas no processo de fagocitose nesses animais.

Um dos mecanismos responsáveis pela exacerbação da migração leucocitária em animais ANXA1 null, em modelos de inflamação aguda induzidos pelos inflamogênicos IL-1 α , carragenina e zymosan, foi o aumento da expressão da L-selectina (CD26L)³³.

Um aumento da expressão da integrina CD11b ocorreu nos neutrófilos e monócitos dos animais ANXA1 null nos modelos de inflamação induzidos in vivo pela endotoxina LPS⁴⁴ e in vitro pelos mediadores PAF (fator de ativação de plaquetas), fMLP (formil-metionina-leucina-fenilalanina) ou PMA (forbol 12-miristato 13-acetato)⁵². Esses dados sugerem a participação ativa da ANXA1 endógena na regulação da expressão das moléculas de adesão em diferentes modelos experimentais de inflamação.

Na linhagem dos camundongos ANXA1 null, a inserção do gene LacZ na região do promotor do gene da AnxA1 permitiu a monitoração da atividade gênica da ANXA1 no processo inflamatório induzido por LPS⁴⁴. Nesse modelo demonstrou-se que doses subletais de LPS induziam uma desregulação do processo inflamatório local e sistêmico na ausência da ANXA1 endógena. A ocorrência desse processo levou a 100% de mortalidade dos animais ANXA1 null, enquanto 80% dos animais selvagens sobreviveram⁴⁴. O fenômeno da mortalidade foi revertido com a administração de pequenas doses de ANXA1 humana recombinante. As possíveis alterações celulares e moleculares, conseqüentes à deleção do gene da AnxA1, ainda não estão esclarecidas, mas demonstram o papel fundamental dessa proteína na ativação dos leucócitos nesse modelo experimental de inflamação.

Perspectivas futuras

As propriedades antiinflamatórias da ANXA1 são amplamente estudadas. As investigações contribuem para o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos da ANXA1 e poderão fornecer novas descobertas das funções autócrina/parácrina dessa proteína antiinflamatória.

Além das descrições sobre o padrão de expressão da ANXA1 e sua possível modulação por GC ou pelo processo inflamatório, as pesquisas também enfatizam os efeitos farmacológicos dessa proteína e de seus miméticos. Atualmente, as investigações relacionam o papel e os efeitos da ANXA1 em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica, utilizando animais nocautes para ANXA1 e para os seus receptores, com resultados promissores. Além disso, o estudo da expressão dessa proteína em modelos animais de artrite reumatóide, transplante de pele e inflamação ocular, deverá contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de ação da ANXA1 na resposta inflamatória em diferentes órgãos.

Nas condições isquêmicas, o tratamento de ratos com ANXA1 ou o peptídeo N-terminal Ac2-26 protege contra o dano isquemia-reperfusão e o choque pela inibição na migração e acúmulo de neutrófilos^{36,37}.

A relevância clínica da ANXA1, que atua como um mediador endógeno no controle do extravasamento leucocitário e da lesão tecidual, abriu um novo e excitante capítulo na Biologia Celular e Molecular, com promessa de desenvolvimento de novas terapias antiinflamatórias, possivelmente substituindo os glicocorticóides por compostos derivados da ANXA1. Ao invés da completa inibição do processo pelos glicocorticóides, essa proteína poderá atuar na modulação da inflamação, mimetizando a ação de mediadores antiinflamatórios endógenos, possibilitando a redução dos efeitos colaterais e permitindo uma maior eficiência contra as patologias inflamatórias.

Agradecimentos

SMO – à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP 03/11292-0 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq 307920/2004-6, e CDG - à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, BAP – 3179/2006, Brasil, pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* 2005;26:157-65.
2. Simon SI, Green, CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2005;7:151-85.
3. Rescher U, Gerke V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 2004;117:2631-9.
4. Flower RJ. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 1988;94:987-1015.
5. Perretti M, Gavins FN. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci* 2003;18:60-4.
6. Pepinsky R, Tizard R, Mattaliano R, Sinclair L, Miller G, Broening J, et al. Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin 1. *J Biol Chem* 1988;63:10799-811.
7. Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol* 2004;5:219.
8. Morgan RO, Fernandez MP. Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:508-15.
9. Rodrigues-Lisoni FC, Oliani SM, Buckingham J, Solito E, Tajara EH. Annexin A1 from gene organization to physiology. *Calcium Binding Protein* 2006;1(2):72-6.
10. Smith PD, Moss SE. Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Immunol Gen* 1994;10:241-6.
11. Munn T, Mues G. Human lipocortin 1 similar to ras gene products. *Nature* 1986;332:314-15.
12. Peers SA, Smilie F, Elderfield AJ, Flower RJ. Glucocorticoid and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leukocytes in vivo. *Br J Pharmacol* 1993;108:66-72.
13. Flower RJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:71-6.
14. Oliani SM, Paul-Clark MJ, Christian H, Flower RJ, Perretti M. Neutrophil interaction with inflamed post-capillary venule endothelium alters annexin I expression. *Am J Pathol* 2001;158:603-15.
15. Oliani SM, Christian HC, Manston J, Flower RJ, Perretti M. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of ANX-A1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. *Lab Invest* 2000;80:1429-38.
16. Oliani SM, Perretti M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. *Ital J Anat Embryol* 2001;106:69-77.
17. Oliani SM, Damazo AS, Perretti M. Annexin I localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. *Mediators Inflamm* 2002;11:287-92.
18. Gibbs L, Carollo MG, Damazo AS, Oliani SM, Perretti M. Time-dependent expression of leukocyte-associated annexin 1 in a model of chronic granulomatous inflammation. *Inflamm Res* 2001;51:300-6.
19. Morand EF, Hutchinson P, Hargreaves A, Goulding NJ, Boyce NW, Holdsworth SR. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76(2):195-202.
20. Goulding NJ, Dixey J, Morand EF, Dodds RA, Wilkinson LS, Pitsillides AA, Edwards JC. Differential distribution of annexins-I, -II, -IV, and -VI in synovium. *Ann Rheum Dis* 1995;54(10):841-5.

21. Francis JW, Balazovich KJ, Smolen JE, Margolis DI, Boxer LA. Human neutrophil annexin I promotes granule aggregation and modulates Ca(2+)-dependent membrane fusion. *J Clin Invest* 1992;90:537-44.
22. Perretti M, Flower RJ. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J Leukoc Biol* 2004;76:25-9.
23. Gil CD, La M, Perretti M, Oliani SM. The interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. *Cell Biol Internat* 2006;30:338-44.
24. Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol* 1997;120:1075-82.
25. Allcock GH, Allegra M, Flower RJ, Perretti M. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. *Clin Exp Immunol* 2001;123:62-7.
26. Harris JG, Flower RJ, Perretti M. Alteration of neutrophil trafficking by a lipocortin 1 N-terminus peptide. *Eur J Pharmacol* 1995;279:149-57.
27. Damazo AS, Paul-Clark MJ, Straus AH, Takahashi HK, Perretti M, Oliani SM. Analysis of the Annexin 1 expression in rat trachea. Study of mast cell heterogeneity. *Annexins* 2004;1:12-8.
28. Tasaka K, Hamada M, Mio M. Inhibitory effect of interleukin-2 on histamine release from rat mast cells. *Agent Actions* 1994;41:C26-7.
29. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749-86.
30. Raynal P, van Bergen en Henegouwen PM, Hullin F, Ragab-Thomas JM, Fauvel J, Verkleij A, Chap H. Morphological and biochemical evidence for partial nuclear localization of annexin 1 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;186(1):432-9.
31. Kim SW, Rhee HJ, Ko J, Kim YJ, Kim HG, Yang JM, Choi EC, Na DS. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15712-9.
32. Solito E, Raguene-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*. 1998 Aug;124(8):1675-83.
33. 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;17:253-5.
34. Crosara-Alberto DP, Darini AL, Inoue RY, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br J Pharmacol*. 2002;136(5):645-58.
35. Wu CC, Croxtall JD, Perretti M, Bryant CE, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. 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*. 1995;92(8):3473-7.
36. D'Amico M, Di Filippo C, La M, Solito E, McLean PG, Flower RJ, et al. Lipocortin 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by affecting local leukocyte recruitment. *FASEB J* 2000;14:1867-9.
37. La M, D'Amico M, Bandiera S, Di Filippo C, Oliani SM, Gavins FN, et al. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. *FASEB J* 2001;15:2247-56.
38. Serhan CN, Chiang N. Putting the brakes on neutrophils. *Blood* 2006;107(5):1742-3.
39. 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* 2000;5:831-40.
40. Gavins FN, Kamal AM, D'Amico M, Oliani SM, Perretti M. Formyl-peptide receptor is not involved in the protection afforded by annexin 1 in murine acute myocardial infarct. *FASEB J* 2005;19:100-2.
41. Takano T, Fiore S, Maddox JF, Brady HR, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J Exp Med* 1997;185:1693-704.
42. Perretti M, Flower RJ. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J Immunol*. 1993;150(3):992-9.
43. Yang Y, Hutchinson P, Morand EF. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42(7):1538-44.
44. Damazo AS, Yona S, D'Acquisto F, Flower RJ, Oliani SM, Perretti M. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. *Am J Pathol* 2005;166:1607-17.
45. Perretti M, Flower RJ. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. *Br J Pharmacol*. 1996;118(3):605-10.
46. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002;186:37-46.
47. Solito E, Romero IA, Marullo S, Russo-Marie F, Weksler BB. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *J Immunol*. 2000;165(3):1573-81.
48. Meerschaert J, Furie MB. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J Immunol*. 1995;154(8):4099-112.
49. Strausbaugh HJ, Rosen SD. A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from myeloid cells. *J Immunol*. 2001;166(10):6294-300.
50. de Coupade C, Solito E, Levine JD. 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*. 2003;140(1):133-45.
51. Hayhoe RP, Kamal AM, Solito E, Flower RJ, Cooper D, Perretti M. Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood*, 2006;107(5):2123-30.
52. Chatterjee BE, Yona S, Rosignoli G, Young RE, Nourshargh S, Flower RJ, Perretti M. Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration in vivo and increased responsiveness in vitro. *J Leukoc Biol*. 2005;78(3):639-46.

Correspondência:

Sonia Maria Oliani
 Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP
 Rua Cristóvão Colombo; 2265
 15054-000 - São José do Rio Preto - SP
 Tel: (17) 3221 2381/Fax: (17) 3221 2390
 e-mail: smoliani@ibilce.unesp.br
