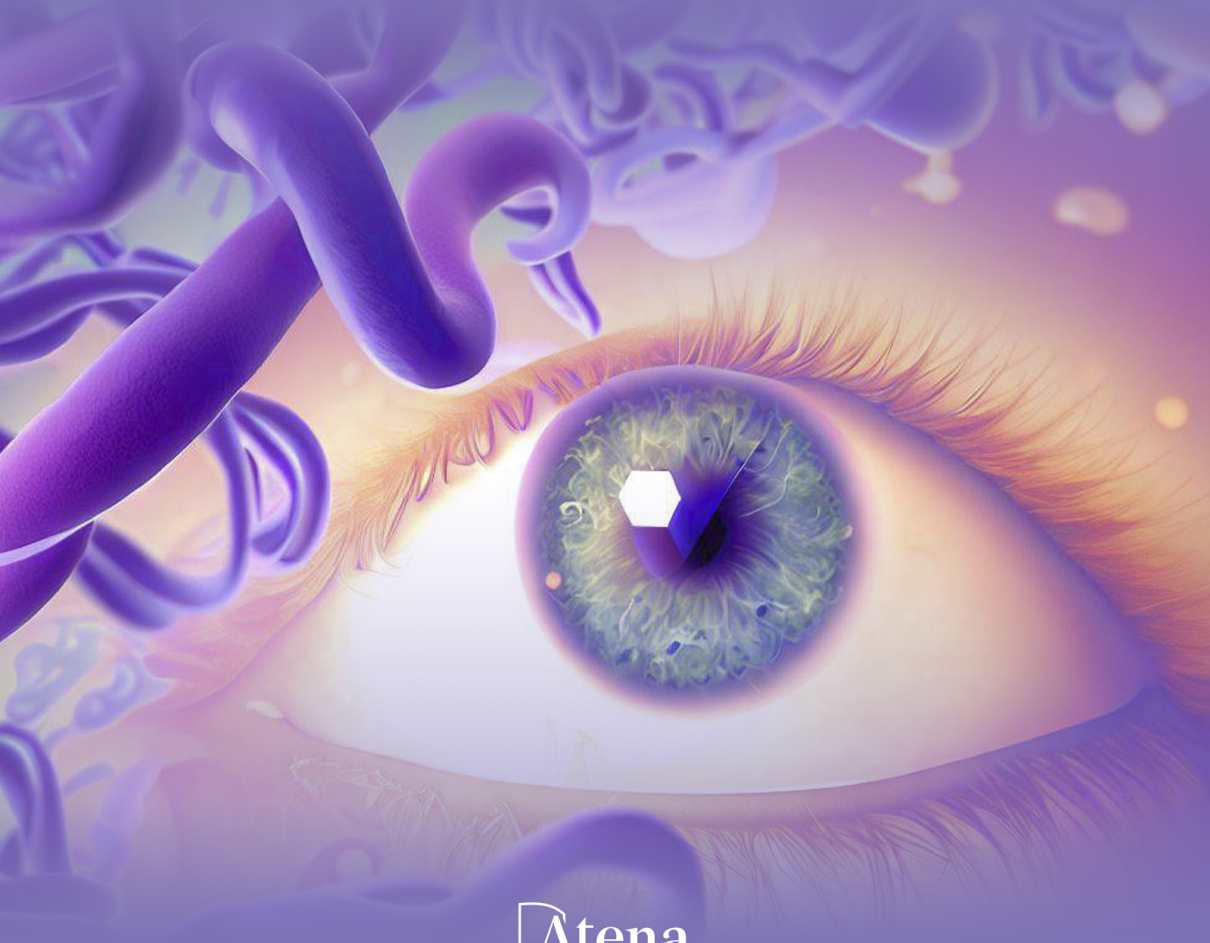


Proteína anti-inflamatória **Anexina A1** como alternativa terapêutica na uveíte autoimune experimental

Sara de Souza Costa
autora

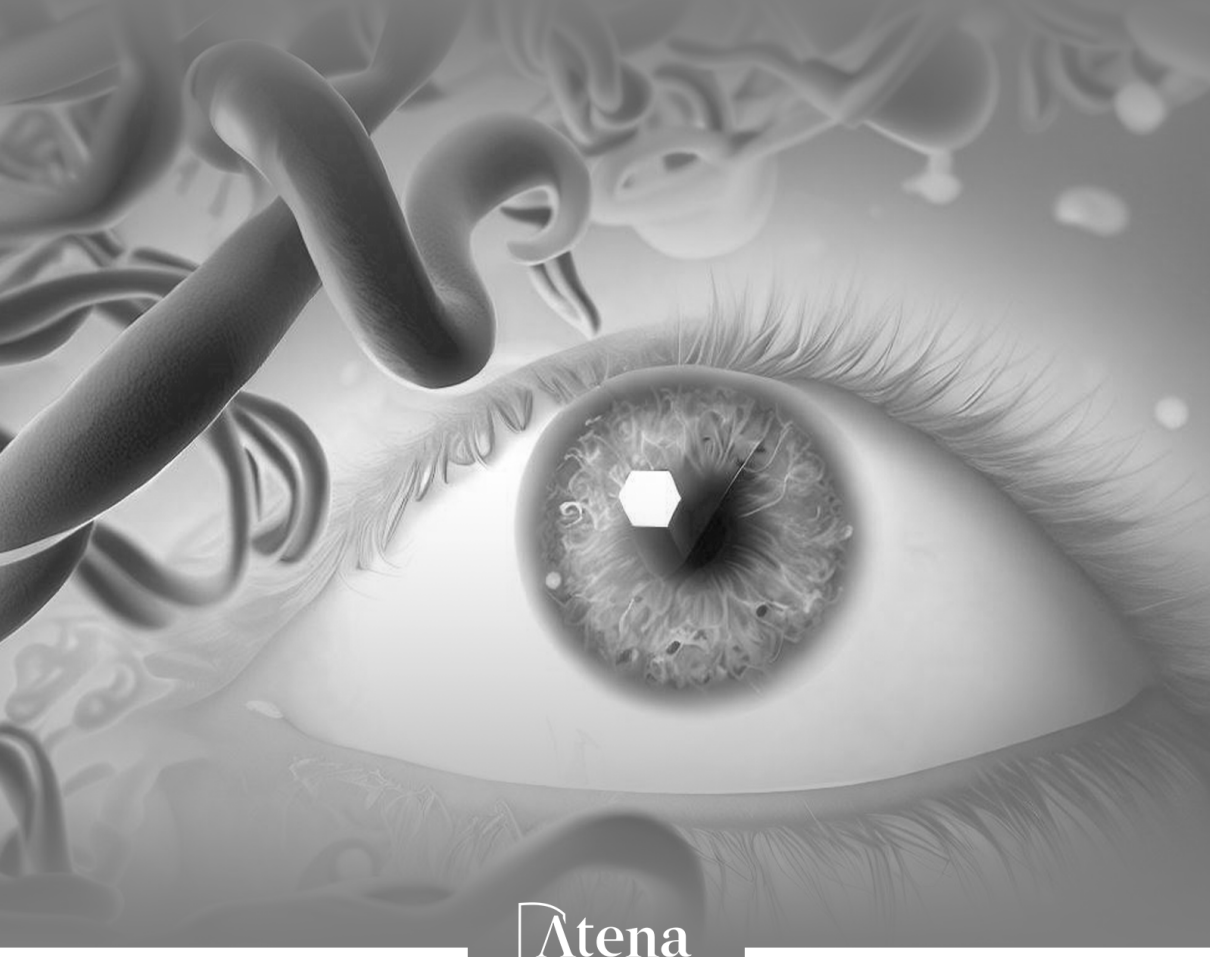
Lucas Possebon | Jéssica Messias da Silva | Ariane Harumi Yoshikawa
Melina Mizusaki Iyomasa Pilon | Maria Elizabete Jimenes de Campos
Sonia Maria Olini | Ana Paula Girol
co-autores



Proteína anti-inflamatória Anexina A1 como alternativa terapêutica na uveíte autoimune experimental

Sara de Souza Costa
autora

Lucas Possebon | Jéssica Messias da Silva | Ariane Harumi Yoshikawa
Melina Mizusaki Iyomasa Pilon | Maria Elizabete Jimenes de Campos
Sonia Maria Oliani | Ana Paula Girol
co-autores



Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Ellen Andressa Kubisty

Luiza Alves Batista

Nataly Evilin Gayde

Thamires Camili Gayde

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2023 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2023 Os autores

Copyright da edição © 2023 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial

Ciências Biológicas e da Saúde

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Camila Pereira – Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto

Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí

Profª Drª Danyelle Andrade Mota – Universidade Tiradentes

Prof. Dr. Davi Oliveira Bizerril – Universidade de Fortaleza

Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília

Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra

Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Guillermo Alberto López – Instituto Federal da Bahia

Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia

Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Delta do Parnaíba–UFDPAr

Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Kelly Lopes de Araujo Appel – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal

Profª Drª Larissa Maranhão Dias – Instituto Federal do Amapá

Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Luciana Martins Zuliani – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas

Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Max da Silva Ferreira – Universidade do Grande Rio

Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará

Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Taísa Ceratti Treptow – Universidade Federal de Santa Maria

Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí

Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Proteína anti-inflamatória Anexina A1 como alternativa terapêutica na uveíte autoimune experimental

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Flávia Roberta Barão
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
P967	Proteína anti-inflamatória Anexina A1 como alternativa terapêutica na uveíte autoimune experimental / Sara de Souza Costa, Lucas Possebon, Jéssica Messias da Silva, et al. - Ponta Grossa - PR: Atena, 2023. Outras autoras Ariane Harumi Yoshikawa Melina Mizusaki Iyomasa Pilon Maria Elizabete Jimenes de Campos Sonia Maria Oliani Ana Paula Girol Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-1833-7 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.337232809 1. Oftalmologia. I. Costa, Sara de Souza. II. Possebon, Lucas. III. Silva, Jéssica Messias da. IV. Título. CDD 617.7
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

A Deus, por mais esta conquista, pela energia e não permitir esmorecer diante das adversidades.

Aos meus pais, Ednéia e Odemir, ao meu irmão, Samuel. Por serem minha base, ensinando e formando meu caráter. À minha família que muito amo. Obrigada pelos momentos maravilhosos, pelo apoio e crédito às minhas conquistas e por, acima de tudo, estarmos sempre unidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processos: 140789/2018-9 e 404190/2016-2.

À minha orientadora, Profa Dra. Ana Paula Girol, meu reconhecimento pela competência e talento profissional. Agradeço por sua orientação nesse trabalho e por todo aprendizado.

À minha coorientadora, Profa Dra. Sonia Maria Oliani, pela oportunidade de aprendizado e experiência.

Aos professores e colegas do IBILCE/UNESP, pelas disciplinas e conhecimento.

A instituição onde desenvolvi meu doutorado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), todos os funcionários que me atenderam nesse período.

Ao Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), onde pude desenvolver parte do meu projeto de pesquisa nos Laboratório Multidisciplinar, Laboratório de Histopatologia e À Unidade Didática e de Pesquisas Experimentais (UDPE).

Às Técnicas e amigas Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon, Ariane Harumi Yoshikawa, Jéssica Messias da Silva e Helena Ribeiro Souza, que me auxiliaram com todo carinho e disposição neste trabalho.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação, e ao Lucas Possebon, pelo auxílio durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos amigos que sempre me apoiaram e incentivaram. Enfim, a tantos outros que de alguma maneira colaboraram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
mm ²	Milímetros quadrados
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
ABCA1	Transportador de cassetes de ligação ao ATP
Ac2-26	Peptídeo mimético Ac2-26 da proteína anexina
ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Anexina A1
ANXA 1	Gene da Anexina A1
ARPE-19	Células do epitélio pigmentar da retina
BSA	Albumina bovina
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BAX	B-cell lymphoma 2 associado a proteína X
C	Grupo controle
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i> (adjuvante completo de Freund)
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
cPLA2	Cytosolic phospholipase A2 (fosfolipase A2 citosólica)
DAB	Diaminobenzina
DB	Doença de Behçet
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.M	Densidade óptica média
EAU	Experimental autoimmune uveitis (uveíte experimental autoimune)
ED-1	Macrófago
EIU	Uveíte induzida por endotoxina
FPRs	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos formilados)
FPR1	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos formilados 1)
FPRL-1	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos formilados 2)
FPR2	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos formilados 2)
FPR2/ALX	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos formilados 2)
FPR3	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos formilados 2)
g	grama
GCs	Glicocorticoides
HA	Humor aquoso
HE	Hematoxilina e Eosina
hrAnx-A1	Anexina A1 recombinante humana
IRBP	Proteína ligadora de retinoide do interfotoreceptor
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IFN-γ	Interferon gama
i.p	Intraperitoneal

kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LXA4	Lipoxina A4
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
mg	miligrama
MHCII	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II
ml	mililitro
n	Número de amostra
NFkB	Fator de transcrição nuclear kB
p	Valor de p (significância do teste estatístico)
P	Grupo preventivo
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBS-T	Tampão fosfato de sódio com Triton X-100
Rpm	Rotação por minuto
SAA	Amiloide sérica A
SCF	Stem cell fator
S.E.M	Standard error of mean (erro padrão de média)
T	Grupo terapêutico
Th	T helper
Th1	T helper 1
Th17	T helper 17
TNF- α	Tumor necrosis factor- α (Fator de necrose tumoral- α)
TGP	Glicosídeos totais de Peônia
UDPE	Unidade Didática e de Pesquisa Experimental
VKH	Vogt-Koyanagi-Harada
vs	Versus

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
Anexina A1 e Inflamação	4
AnxA1 e olho	6
OBJETIVOS	9
Objetivo Geral	9
Objetivos Específicos	9
RESULTADOS	10
MANUSCRITO	11
Introdução	13
Materiais e Métodos	15
Animais	15
Modelo experimental de uveíte autoimune e protocolos de tratamento	15
Avaliação Clínica da EAU	15
Análise histopatológica	16
Análise quantitativa de leucócitos no humor aquoso	16
Análise imuno-histoquímica	16
Análise de proteínas em sobrenadantes de tecido ocular após maceração	17
Análise quantitativa dos níveis de citocinas	17
Análise estatística	17
Resultados	18
Avaliação Clínica da EAU	18
Tratamentos preventivos e terapêuticos reduzem o influxo de leucócitos na EAU	18
A administração do peptídeo Ac2-26 modula as expressões AnxA1 e fpr2	19
Os tratamentos inibem a liberação de mediadores inflamatórios	19

Discussão	20
Conclusão	24
Referências	24
CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

RESUMO

A uveíte autoimune é uma importante inflamação ocular relacionada à perda visual. A proteína Anexina A1 (AnxA1) e seu peptídeo mimético, Ac2-26, foram pesquisados em diferentes condições oculares com perspectivas clínicas. Assim, investigamos, in vivo, os efeitos do Ac2-26 para prevenção e protocolos terapêuticos na uveíte autoimune experimental (EAU). Para induzir EAU, a proteína de ligação a retinoides interfotorreceptores bovina (IRBP) em adjuvante completo de Freund foi inoculada na pata direita de ratos Lewis. Adicionalmente, a toxina de Bordetella pertussis foi injetada intraperitonealmente (i.p.). Ac2-26 foi administrado diariamente (i.p.) seguindo os protocolos preventivos (a partir do dia 1) ou terapêuticos (a partir do dia 8). Ambos os tratamentos foram realizados até o dia 13 após a indução da EAU e a gravidade da EAU foi avaliada diariamente. A quantificação de leucócitos foi realizada em humor aquoso (AqH). As expressões de AnxA1, receptor de formil-peptídeo-2 (fpr2), ciclooxigenase-2 (COX-2) e quantificação de macrófagos (ED1) foram avaliados por imuno-histoquímica. Linfócitos CD4 e CD8, AnxA1 e fpr2 foram estudados por Western blotting. Interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1 foram medidos em sobrenadante de macerado ocular. Clinicamente, os olhos dos ratos induzidos por EAU apresentaram características macroscópicas alteradas e, nos grupos tratados, os parâmetros normais foram restabelecidos. Leucócitos, predominantemente linfócitos, foram encontrados no grupo EAU não tratado, enquanto a redução de CD4, CD8 e ED1 ocorreu nos animais tratados. Além disso, Ac2-26 diminuiu a imunorreatividade de AnxA1, fpr2 e COX-2 em segmentos oculares e sobrenadantes. Além disso, níveis reduzidos de IL-2, IFN- γ e IL-10 foram detectados em grupos tratados com Ac2-26. Entre os tratamentos, a administração terapêutica foi mais eficaz. Os dados mostram os efeitos benéficos do Ac2-26 em EAU com potencial para aplicação terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: Inflamação ocular. Uveíte autoimune. Anexina A1. Mediadores inflamatórios.

ABSTRACT

Autoimmune uveitis is an important ocular inflammation related to visual loss. Annexin A1 (AnxA1) protein and its mimetic peptide, Ac2-26, have been researched in different eye conditions with clinical perspectives. Thus, we investigated, *in vivo*, the Ac2-26 effects for prevention and therapeutic protocols in the experimental autoimmune uveitis (EAU). To induce EAU, bovine interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in complete Freund's adjuvant was inoculated in the right paw of Lewis rats. Additionally, Bordetella pertussis toxin was injected intraperitoneally (i.p.). Ac2-26 was daily administered (i.p.) following the preventive (from day 1) or therapeutic (from day 8) protocols. Both treatments were performed until day 13 after EAU induction and EAU severity was daily assessed. The quantification of leukocytes was performed in aqueous humor (AqH). AnxA1, formyl-peptide receptor-2 (fpr2), cyclooxygenase-2 (COX-2) expressions and macrophage quantification (ED1) were evaluated by immunohistochemistry. CD4 and CD8 lymphocytes, AnxA1 and fpr2 were studied by Western blotting. Interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukins (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17) and *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 were measured in ocular macerate supernatant. Clinically, the eyes of the EAU-induced rats showed altered macroscopic characteristics, and in the treated groups, normal parameters were reestablished. Leukocytes, predominantly lymphocytes, were found in the untreated-EAU group, while reduction of CD4, CD8 and ED1 occurred in treated animals. In addition, Ac2-26 decreased AnxA1, fpr2 and COX-2 immunoreactivity in ocular segments and supernatants. Furthermore, reduced levels of IL-2, IFN- γ and IL-10 were detected in Ac2-26-treated groups. Between the treatments, therapeutic administration was more effective. Data show the beneficial effects of Ac2-26 in EAU with potential for therapeutic application

KEYWORDS: Eye inflammation. Autoimmune uveitis. Annexin A1. Inflammatory mediators.

INTRODUÇÃO

Uveíte é o nome usado clinicamente para descrever inflamações intraoculares de diferentes tipos e etiologias e que acometem a túnica média do olho ou úvea (íris, corpo ciliar e corioide), podendo afetar, ainda, o vítreo, a retina e o nervo óptico (PASADHIKA E ROSENBAUM, 2014; RONG *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2020). Anatomicamente e, de acordo com as estruturas acometidas, a uveíte pode ser classificada em anterior, intermediária, posterior e panuveíte (BANSAL, GUPTA E GUPTA, 2010).

Como um grupo de desordens oculares, a uveíte é uma das mais prejudiciais condições oculares em humanos e uma das principais causas de cegueira no mundo (READ, 2006; AGRAWAL *et al.*, 2010; GAMALERO *et al.*, 2019). Essa inflamação atinge indivíduos de ambos os sexos e pode ocorrer em qualquer faixa etária, afetando com maior frequência a população adulta jovem e profissionalmente ativa, entre 20 a 59 anos. Embora menos comum na infância, a uveíte pode causar diminuição severa da acuidade visual em longo prazo, apresentando impacto social relevante (OOI *et al.*, 2006; PASADHIKA E ROSENBAUM, 2014).

Na uveíte, a inflamação é caracterizada pelo acúmulo de leucócitos nos tecidos oculares e liberação de citocinas, sendo um processo doloroso, associado à vermelhidão, fotofobia, visão dificultada e “moscas volantes” (BANSAL, GUPTA E GUPTA, 2010; TSIROUKI *et al.*, 2018; FORRESTER, KUFFOVA E DICK, 2018; CHOI, RIVERA-GRANA E ROSENBAUM, 2019). A natureza recorrente desse processo inflamatório pode resultar em complicações secundárias como catarata, glaucoma, edema macular, descolamento de retina e, por fim, destruição dos tecidos oculares e cegueira (BABU E RATHINAM, 2010; JANCEVSKI E FOSTER, 2010; SRIVASTAVA, RAJAPPA E KAUR, 2010; YANG *et al.*, 2016; TSIROUKI *et al.*, 2018). Pode ser dividida em duas categorias, incluindo uveíte infecciosa (bactérias, vírus, fungos e parasitas) e uveíte não infecciosa de acordo com sua etiologia, entre os quais, a doença de Behçet (DB), espondilite anquilosante, Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), síndrome de Reiter e artrite reumatoide juvenil (HEILIGENHAUS *et al.*, 2010; SCHWARTZMAN, 2016; PAPOTTO *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2020).

A uveíte autoimune experimental (experimental autoimmune uveitis - EAU) é um modelo bem estabelecido (GERY *et al.*, 1986; GASPARIN *et al.*, 2012; EGWUAGU E LARKIN III, 2013) e tem sido amplamente utilizado no entendimento da patogênese da uveíte imunomediada que atinge principalmente o segmento posterior do olho (corioide e retina) (YADAV *et al.*, 2011; FANG *et al.*, 2013; BHUYAN *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2016). Na EAU, o processo inflamatório é induzido por antígenos de origem retiniana, como o antígeno-S e a proteína ligadora de retinoide do interfotorreceptor (IBRP) em adjuvante de Freund completo, além de exotoxinas bacterianas (OOI *et al.*, 2006; GASPARIN *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2020). Nesse modelo a resposta inflamatória é desencadeada por linfócitos, especialmente os CD4⁺, que reconhecem os antígenos por meio das células apresentadoras

de antígenos e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII), havendo polarização de linfócitos T helper (Th)0 para o perfil Th1 e Th17 (OOI *et al.*, 2006; GASPARIN *et al.*, 2012; EGWUAGU E LARKIN III, 2013; GUEDES, BORREGO, PROENÇA, 2016; ZHONG *et al.*, 2020). Em ratos da linhagem Lewis, a inflamação pode ser severa e se inicia de 8 a 12 dias após a imunização com IRBP, com duração de 5 a 10 dias (GASPARIN *et al.*, 2012).

O tratamento da uveíte é baseado no grau da inflamação, existência de fatores de riscos e complicações associadas (GAMALERO *et al.*, 2019). Uma vez que o diagnóstico é realizado, uma abordagem escalonada é utilizada, começando com tratamentos menos agressivos para os mais agressivos, em busca de induzir a remissão da inflamação (GAMALERO *et al.*, 2019). Os *corticosteroides* têm sido utilizados como terapia de primeira linha, somados com fármacos quimioterápicos, inibidores do fator de necrose tumoral (TNF)- α , entre outros. Porém, muitas opções de tratamento podem estar relacionadas a efeitos colaterais limitando seus usos, levando a novas buscas e amplo uso de outras *drogas imunomoduladoras* (SRIVASTAVA, RAJAPPA E KAUR, 2010; GUEDES, BORREGO, PROENÇA, 2016; DUICA *et al.*, 2018; GAMALERO *et al.*, 2019). Portanto, o aprofundamento da compreensão sobre os mecanismos inflamatórios e a descoberta de vários mediadores anti-inflamatórios endógenos fornecem novas possibilidades de tratamento da uveíte, como propostas para substituição dos métodos atuais devido aos seus efeitos adversos (YADAV *et al.*, 2011; FANG *et al.*, 2013; BHUYAN *et al.*, 2014; SCHWARTZMAN, 2016; GAMALERO *et al.*, 2019).

Entre os mediadores anti-inflamatórios, a proteína Anexina A1 (AnxA1), que desempenha um papel na limitação do processo inflamatório (GAVINS *et al.*, 2005; D'ACQUISTO, 2009; YAZID *et al.*, 2015; SUGIMOTO *et al.*, 2016), pode representar uma terapia alternativa para a uveíte (DA SILVA, GIROL E OLIANI, 2011; GIROL *et al.*, 2013; GIROL *et al.*, 2021).

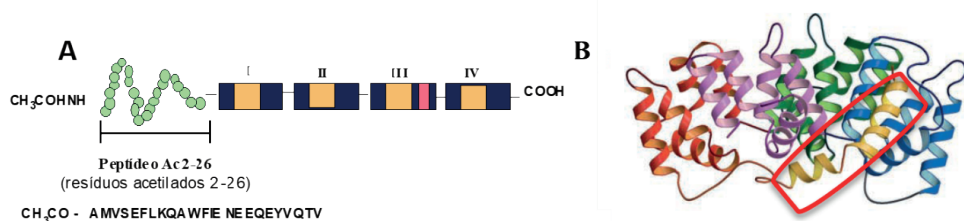
1.1 Anexina A1 e Inflamação

A AnxA1 é uma proteína de 37 kDa que exhibe sítios de ligação ao cálcio e aos fosfolipídios de membrana, sendo a sua síntese induzida por glicocorticoides, o que confere propriedades anti-inflamatórias (PERRETTI E GAVINS, 2003; D'ACQUISTO, PERRETTI E FLOWER, 2008). Em vertebrados, foram descritos doze membros da família das anexinas (PEPINSKY *et al.*, 1988; RAYNAL E POLLARD, 1994; GOBBETTI E COORAY, 2016; SCHLOER, PAJONCZYK E RESCHER, 2018), e em humanos, o gene AnxA1, se localiza na região cromossômica 9q12-9q21.2 (HUEBNER *et al.*, 1988; HAN *et al.*, 2020).

As anexinas possuem dois domínios em sua estrutura, uma pequena região N-terminal, que varia em comprimento e sequência e, um domínio central fortemente conservado (MUNN E MUES, 1986; LIM E PERVAIZ, 2007; LIZARBE *et al.*, 2013; HAN

et al., 2020). O domínio N-terminal, sendo único para cada tipo de anexina, confere as atividades e funções específicas, apresentando sítios para processos pós-traducionais, tais como, fosforilação, glicosilação e proteólise (PERRETTI E FLOWER, 2004; SOLITO *et al.*, 2006; PERRETTI E D'ACQUISTO, 2009; LIZARBE *et al.*, 2013). As funções da AnxA1 podem ser mimetizadas pelos primeiros aminoácidos da porção N-terminal da proteína (peptídeo Ac2-26) (CIRINO *et al.*, 1993), ou por peptídeos menores (PERRETTI *et al.*, 2001). A representação esquemática da estrutura primária e o arranjo tridimensional da AnxA1 são mostrados na figura 1.

Figura 1 - (A) Representação esquemática da estrutura primária da proteína AnxA1, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26). (B) Ilustração do arranjo tridimensional dessa proteína.



Fonte: RESCHER; GERKE, 2004.

A AnxA1 desempenha muitos papéis na fisiologia celular, é altamente conservada entre as espécies e amplamente distribuída em muitos tipos de células, em especial as células relacionadas aos processos de defesa (KAMAL, FLOWER E PERRETTI, 2005) como neutrófilos (PERRETTI *et al.*, 2000; ALLCOCK *et al.*, 2001; OLIANI *et al.*, 2001; SOLITO *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2020); mastócitos (OLIANI *et al.*, 2000; DA SILVA, GIROL E OLIANI, 2011), eosinófilos (OLIANI, DAMAZO E PERRETTI, 2002), monócitos (SOLITO *et al.*, 2001) e linfócitos (D'ACQUISTO *et al.*, 2007; D'ACQUISTO *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2016).

A inflamação é uma resposta defensiva que ocorre quando os tecidos são danificados, desempenhando um papel importante na restauração da homeostase (SHAO *et al.*, 2019). A identificação inicial da AnxA1 como mediador endógeno abriu caminho para que essa molécula fosse investigada como um agente anti-inflamatório por diversos pesquisadores (OLIANI *et al.*, 2001; DAMAZO *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2012). Além do processo inflamatório, a AnxA1 pode estar relacionada a uma variedade de condições patológicas, como câncer e doenças autoimunes (ROVIEZZO *et al.*, 2002; LIM E PERVAIZ, 2007).

Por muitos anos, nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos da AnxA1 em processos alérgicos (SENA *et al.*, 2006), aspectos da biologia tumoral (RODRIGUES-LISONI *et al.*, 2006; GASTARDELO *et al.* 2014; TAKAOKA *et al.*, 2018; TADEI *et al.*, 2018)

e, principalmente, nas inflamações experimentais (OLIANI *et al.*, 2001; GASTARDELO *et al.*, 2009; GIROL *et al.*, 2013; GIMENES *et al.*, 2015; POSSEBON *et al.*, 2018). A AnxA1, endógena ou exógena, tem capacidade de inibição de mediadores pró-inflamatórios e inibir a transmigração leucocitária (LIM E PERVAIZ, 2007; PERRETTI E D'ACQUISTO, 2009, LIZARBE *et al.*, 2013; SUGIMOTO *et al.*, 2016; SHEIKH E SOLITO, 2018), agindo também na imunidade adaptativa, sendo expressa em baixo nível nas células T e elevada em processos inflamatórios (BRUSCHI *et al.*, 2018).

Outro aspecto importante na biologia da AnxA1 tem sido o estudo do seu mecanismo de ação na superfície celular. A AnxA1 e seus peptídeos miméticos exibem efeitos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios, e os efeitos anti-inflamatórios são regulados principalmente pelas vias de sinalização da família de receptores de formil peptídeos (FPRs) (WALTHER, RIEHEMANN E GERKE, 2000; SHAO *et al.*, 2019). Os receptores FPR são encontrados em humanos, sendo conhecidos como FPR1, FPR2/ALX (também conhecido como FPRL-1) e FPR3 (YE *et al.*, 2009), já nos roedores incluem *fpr1* e *fpr2*.

Investigações realizadas em nosso laboratório mostraram, a colocalização ultraestrutural da AnxA1 com o receptor *fpr2* em neutrófilos de camundongos induzidos à peritonite aguda, indicando que a ação anti-inflamatória da AnxA1 pode ser mediada pelo receptor *fpr2* (GASTARDELO, *et al.*, 2009). Em outra pesquisa realizada no modelo de uveíte induzida por endotoxina (EIU) em ratos e com células do epitélio pigmentar da retina (ARPE-19) ativadas pelo lipopolissacarídeo (LPS) a inibição da liberação de mediadores inflamatórios ocorreu após ativação dos receptores *fpr2* pela AnxA1 endógena translocada e pelo peptídeo mimético Ac2-26 (GIROL *et al.*, 2013).

1.2 AnxA1 e olho

Como mencionado anteriormente, a proteína AnxA1 foi estudada em vários modelos de inflamação, no entanto, em condições normais ou patológicas, especialmente em condições inflamatórias, ainda foi pouco estudada em tecidos oculares. Nos últimos anos, o papel da proteína AnxA1 nos processos inflamatórios oculares tem sido investigado em nosso laboratório em estudos *in vivo* e *in vitro* (DA SILVA, GIROL E OLIANI, 2011; MIMURA *et al.*, 2012; GIROL *et al.*, 2013; GIMENES *et al.*, 2015; CARDIN *et al.*, 2017; DA SILVA, *et al.*, 2019, MARMORATO *et al.*, 2019; GIROL *et al.*, 2021).

A modulação positiva da AnxA1 endógena nas células inflamatórias nos olhos de camundongos e nas células ARPE-19 infectadas pelo *Toxoplasma gondii* sugere a proteína como alvo terapêutico na toxoplasmose ocular (MIMURA *et al.*, 2012). No modelo de ceratite infecciosa induzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, a expressão exacerbada da proteína AnxA1 sugere ação compensatória no controle de migração leucocitária, especialmente os neutrófilos (DA SILVA *et al.*, 2019).

Nos processos alérgicos de conjuntivite o potencial envolvimento dos *fprs* e o efeito

protetor do peptídeo mimético Ac2-26 foi estudado no modelo de conjuntivite alérgica induzida por ovalbulmina em camundongos selvagem e nocautes para AnxA1 (Anxa1^{-/-}) (MARMORATO *et al.*, 2019). Esses autores mostraram níveis aumentados de fpr1 e fpr2 na conjuntiva dos animais induzidos a conjuntivite alérgica e que a ausência da AnxA1 endógena exacerba a expressão de fpr2. Trabalho anterior do grupo, mostrou que animais Anxa1^{-/-} exibem um perfil alérgico exacerbado e que a administração de Ac2-26 foi suficiente para reduzir a liberação de IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, eotaxina e RANTES no olho e linfonodo (GIMENES *et al.*, 2015). Outro estudo *in vitro* com mastócitos derivados de cultura da medula óssea de animais selvagens e Anxa1^{-/-} sugerem que as drogas cromoglicato e nedocromil evitam a degranulação dos mastócitos por meio da liberação da proteína AnxA1. Os mastócitos de camundongos Anxa1^{-/-} liberaram quantidades aumentadas de histamina, IL-5, IL-6, IL-9 e MCP-1 (SINNIAH *et al.*, 2019).

O tratamento com o peptídeo Ac2-26 em células ganglionares da retina em privação de soro, mimetizando característica do glaucoma, diminuiu a apoptose, por meio do aumento da expressão de B-cell lymphoma 2 (bcl-2) e redução das expressões de caspase 3 e BCL-2 associated protein X (bax) de uma maneira dose-dependente (SUN *et al.*, 2012). Em modelo animal de glaucoma induzido por isquemia-reperfusão ocorreu diminuição da expressão do transportador de cassetes de ligação ao ATP (ABCA1) na camada de células ganglionares o que causa diminuição na translocação da AnxA1 para a membrana celular e sua secreção, desta maneira, favorecendo a inflamação e a apoptose (LI *et al.*, 2018). No contexto de retinopatias isquêmicas e vasculares há indicações do envolvimento da AnxA1 na regulação de eventos que acontecem nestas patologias, como por exemplo, a neovascularização. Em porcos com oclusões venosa retiniana, foi demonstrado aumento da expressão da AnxA1, principalmente em células ganglionares (CEHOFSKI *et al.*, 2018).

Em modelos de uveíte, a expressão da AnxA1 nos leucócitos e humor aquoso (HA) foi observada na EIU em ratos (DA SILVA, GIROL e OLIANI, 2011) e aponta essa proteína como um dos mediadores essenciais na homeostasia do processo inflamatório. O mecanismo de ação e o uso potencial da AnxA1 e do peptídeo Ac2-26 foram demonstrados na EIU em roedores e nas células ARPE-19 ativadas pelo LPS (GIROL *et al.*, 2013). Os resultados desta investigação mostraram que, após fosforilação específica em serina, a AnxA1 pode ser translocada para superfície celular onde interage com o receptor fpr2 e inibe a liberação de mediadores inflamatórios independente da via de sinalização do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) e, provavelmente, de maneira pós-traducional. Em outro estudo *in vitro* das células ARPE-19, o peptídeo Ac2-26 reduziu a liberação de mediadores inflamatórios, desempenhando um papel regulador na inflamação ocular (CARDIN *et al.*, 2017).

Da mesma forma que na EIU, a uveíte não infecciosa apresenta superexpressão de AnxA1 na retina humana e em camundongos. O tratamento intravitreal com AnxA1 recombinante humana (hrAnx-A1), na EAU em camundongos mostrou redução dose-

dependente da infiltração de neutrófilos (GARDNER *et al.*, 2017). Com administração sistêmica diária de hrAnx-A1 foi observada diminuição da proliferação de células CD4⁺ autorreativas, expressão reduzida de citocinas pró-inflamatórias IL-17, IFN- γ e IL-6, atenuação do desenvolvimento de EAU. Além disso, a deficiência de AnxA1 está correlacionada com a uveíte humana (YAZID *et al.*, 2015). Esses dados estimulam novas propostas de abordagens terapêuticas com AnxA1 também para uveíte não infecciosa.

Diante dessas considerações e da necessidade de novas terapias para o tratamento da uveíte, em substituição às atuais que apresentam efeitos adversos (READ, 2006; LEE E FOSTER, 2010; SCHWARTZMAN, 2016), o estudo da proteína AnxA1 endógena e do seu peptídeo mimético Ac2-26 na uveíte autoimune experimental é importante, pois reforça os estudos da AnxA1 nos processos inflamatórios oculares e poderá ocasionar novas descobertas terapêuticas para o tratamento dessa doença.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O modelo experimental de EAU foi realizado para investigar, *in vivo*, o possível efeito anti-inflamatório do peptídeo mimético Ac2-26 da AnxA1, nessa condição experimental.

2.2 Objetivos Específicos

Em animais controles, induzidos a EAU sem tratamento e tratados intraperitonealmente (i.p.) com o peptídeo Ac2-26 em protocolos preventivo e terapêutico:

- I. Avaliar a severidade da EAU, clinicamente e histopatologicamente;
- II. Quantificar os leucócitos no humor aquoso;
- III. Quantificar os macrófagos nos olhos;
- IV. Analisar a expressão da AnxA1, fpr2 e COX-2 nos tecidos oculares;
- V. Analisar a expressão da AnxA1, fpr2 e linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos sobrenadantes dos macerados oculares;
- VI. Dosar nos sobrenadantes oculares após maceração, os mediadores químicos TNF- α , IFN- γ , interleucina IL-2, IL-17 e MCP-1 (pró-inflamatórios) e IL-4, IL-10 (anti-inflamatórios).

RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma de um manuscrito, de acordo com as normas da revista *Experimental Eye Research*.

Ainda, durante o período do doutoramento tive a oportunidade de participar de outras investigações realizadas nos laboratórios de pesquisa da UNIFIPA, algumas delas também relacionadas ao PPG em Biociências, IBILCE, UNESP. Essas investigações envolveram a proteína AnxA1 em outras condições oftalmológicas e estão indicadas nos apêndices.

Perfil anti-inflamatório do peptídeo Ac2-26 em tratamentos preventivos e terapêuticos em uveítes autoimunes experimentais

Sara de Souza Costa

Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.
Universidade Estadual Paulista/ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE) – São José do Rio Preto/SP, Brasil.

Lucas Possebon

Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.
Universidade Estadual Paulista/ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE) – São José do Rio Preto/SP, Brasil.

Jéssica Messias da Silva

Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.

Ariane Harume Yoshikawa

Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.

Melina Mizusaki Iyomasa Pilon

Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.

Maria Elizabete Jimenes de Campos

Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.

Sonia Maria Oliani

Universidade Estadual Paulista/ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE) – São José do Rio Preto/SP, Brasil.

Ana Paula Girol

Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.
Universidade Estadual Paulista/ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE) – São José do Rio Preto/SP, Brasil.
Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), São Paulo, Brasil.

Correspondente: Profa. Dra. Ana Paula Girol

Departamento de Ciências Físicas e Biológicas, Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA).

Suporte Financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (140789/2018-9 e 404190/2016-2) e UNIFIPA

RESUMO: A uveíte autoimune é uma importante inflamação ocular relacionada à perda visual. A proteína Anexina A1 (AnxA1) e seu peptídeo mimético, Ac2-26, foram pesquisados em diferentes condições oculares com perspectivas clínicas. Assim, investigamos, in vivo, os efeitos do Ac2-26 para prevenção e protocolos terapêuticos na uveíte autoimune experimental (EAU). Para induzir EAU, a proteína de ligação a retinoides interfotorreceptores bovina (IRBP) em adjuvante completo de Freund foi inoculada na pata direita de ratos Lewis. Adicionalmente, a toxina de Bordetella pertussis foi injetada intraperitonealmente (i.p.). Ac2-26 foi administrado diariamente (i.p.) seguindo os protocolos preventivos (a partir do dia 1) ou terapêuticos (a partir do dia 8). Ambos os tratamentos foram realizados até o dia 13 após a indução da EAU e a gravidade da EAU foi avaliada diariamente. A quantificação de leucócitos foi realizada em humor aquoso (AqH). As expressões de AnxA1, receptor de formil-peptídeo-2 (fpr2), ciclooxigenase-2 (COX-2) e quantificação de macrófagos (ED1) foram avaliados por imuno-histoquímica. Linfócitos CD4 e CD8, AnxA1 e fpr2 foram estudados por Western blotting. Interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1 foram medidos em sobrenadante de macerado ocular. Clinicamente, os olhos dos ratos induzidos por EAU apresentaram características macroscópicas alteradas e, nos grupos tratados, os parâmetros normais foram restabelecidos. Leucócitos, predominantemente linfócitos, foram encontrados no grupo EAU não tratado, enquanto a redução de CD4, CD8 e ED1 ocorreu nos animais tratados. Além disso, Ac2-26 diminuiu a imunorreatividade de AnxA1, fpr2 e COX-2 em segmentos oculares e sobrenadantes. Além disso, níveis reduzidos de IL-2, IFN- γ e IL-10 foram detectados em grupos tratados com Ac2-26. Entre os tratamentos, a administração terapêutica foi mais eficaz. Os dados mostram os efeitos benéficos do Ac2-26 em EAU com potencial para aplicação terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: inflamação ocular, uveíte autoimune, Ac2-26, mediadores inflamatórios.

1 | INTRODUÇÃO

A uveíte é uma inflamação intraocular que afeta a camada uveal e pode atingir o vítreo, retina e nervo óptico (Pasadhika e Rosenbaum, 2014; Rong et al., 2016; Zhong et al., 2020). Essa inflamação é caracterizada pelo acúmulo de leucócitos nas túnicas oculares e liberação de citocinas, sendo um processo doloroso, associado a vermelhidão, fotofobia e comprometimento da visão (Bansal, Gupta e Gupta, 2010). Episódios repetitivos do processo inflamatório podem levar a complicações secundárias, causando destruição das camadas oculares e cegueira (Babu e Rathinam, 2010; Jancevski e Foster, 2010; Srivastava, Rajappa e Kaur, 2010; Yang et al., 2016; Forrester, Kuffova e Dick, 2018).

Na uveíte autoimune experimental (EAU), o processo inflamatório é induzido por antígenos de origem retiniana, como o antígeno S e a proteína de ligação ao retinoide interfotorreceptor (IBRP) em adjuvante completo de Freund, além de exotoxinas bacterianas (Ooi et al., 2006; Gasparin et al., 2012; Li et al., 2020). Nesse modelo, a resposta inflamatória é desencadeada por linfócitos, principalmente CD4+, com polarização dos linfócitos T auxiliares (Th)0 para o perfil Th1 e Th17 (Ooi et al., 2006; Gasparin et al., 2012; Ekwuagu e Larkin, 2013; Guedes, Borrego e Proença, 2016; Zhong et al. 2020).

Atualmente, o tratamento farmacológico da uveíte inclui corticosteroides, quimioterápicos e inibidores do fator de necrose tumoral (TNF)- α . No entanto, os efeitos colaterais desses medicamentos, como aumento da pressão intraocular ou citotoxicidade, limitam seus usos (Heiligenhaus et al., 2010; Lee e Foster, 2010; Rosenbaum, 2010; Srivastava, Rajappa e Kaur, 2010; Guedes, Borrego e Proença, 2016; Zhong, et al., 2020). Dentre os mediadores anti-inflamatórios, a proteína Anxina A1 (AnxA1) atua na limitação do processo inflamatório (Gavins et al., 2005; D'acquisto, 2009; Yazid et al., 2015; Sugimoto et al., 2016) e pode representar uma terapia alternativa para o tratamento da uveíte (Da Silva, Girol e Oliani, 2011; Girol et al., 2013; Girol et al., 2021).

A AnxA1, seja endógena ou exógena, regula as atividades imunes inatas, principalmente o processo de produção de mediadores pró-inflamatórios e de transmigração (Lim e Pervaiz, 2007; Perretti e D'acquisto, 2009, Lizarbe et al., 2013; Sugimoto et al. al, 2016). Esses efeitos garantem que níveis suficientes de ativação celular sejam alcançados, mas não excedidos, proporcionando assim a homeostase do processo inflamatório.

Nos últimos anos, o papel da proteína AnxA1 nos processos inflamatórios oculares tem sido investigado em nosso laboratório em estudos in vivo e in vitro (Da Silva, Girol e Oliani, 2011; Mimura et al., 2012; Girol et al., 2013; Gimenes et al., 2015; Cardin et al., 2017; Da Silva, et al., 2019, Marmorato et al., 2019; Girol et al., 2021). A modulação positiva de AnxA1 endógena foi observada em células inflamatórias em olhos de camundongos e em células ARPE-19 infectadas por *Toxoplasma gondii* (Mimura et al., 2012). Em córneas de camundongos no modelo de ceratite infecciosa induzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, a expressão de AnxA1 foi exacerbada na linhagem C57 considerada mais

suscetível que Balb/c, o que sugere uma ação compensatória no controle da migração leucocitária, principalmente de neutrófilos (Da Silva, e outros, 2019).

Nos processos alérgicos in vivo de conjuntivite, o potencial envolvimento de receptores de formil-peptídeo (fprs) e o efeito protetor do peptídeo mimético Ac2-26 foi estudado no modelo de conjuntivite alérgica induzida por ovalbulmina em camundongos do tipo selvagem e nocautes AnxA1 (Anxa1 -/-) (Marmorato et al., 2019). Esses autores mostraram níveis aumentados de fpr1 e fpr2 na conjuntiva de animais induzidos à conjuntivite alérgica e também que a ausência de AnxA1 endógena exacerbou a expressão de fpr2. Trabalhos anteriores do grupo mostraram que animais Anxa1-/- apresentam um perfil alérgico exacerbado, mas que a administração de Ac2-26 foi suficiente para reduzir a liberação de interleucina (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-13, eotaxina e Regulada por Ativação, Expressa de Célula T Normal e RANTES Secretada na olhos e linfonodos (Gimenes et al., 2015).

Em relação à uveíte, a expressão de AnxA1 em leucócitos e humor aquoso (AH) foi observada na EIU em ratos (Da Silva, Girol, Oliani, 2011) e aponta essa proteína como um dos mediadores essenciais na homeostase do processo inflamatório. O mecanismo de ação e o uso potencial de AnxA1 e do peptídeo Ac2-26 foram demonstrados em EIU e em células ARPE-19 ativadas por LPS (Girol et al., 2013). Os resultados desta investigação mostraram que, após a fosforilação específica da serina, a AnxA1 pode ser translocada para a superfície celular onde interage com a fpr2 e inibe a liberação de mediadores inflamatórios independentemente da via de sinalização do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) e, provavelmente pós-traducional. Em outro estudo in vitro de células ARPE-19, ativadas por endotoxina lipopolissacarídica bacteriana (LPS), o peptídeo Ac2-26 reduziu a liberação de mediadores inflamatórios, desempenhando um papel regulador na inflamação ocular (Cardin et al., 2017).

Como na EIU, a uveíte não infecciosa superexpressa AnxA1 na retina humana e de camundongo. O tratamento intravítreo com AnxA1 humano recombinante (hrAnx-A1) em EAU em camundongos mostrou uma redução dependente da dose da infiltração de neutrófilos (Gardner et al., 2017). A administração sistêmica diária de hrAnx-A1, diminuiu a proliferação de células CD4+ autorreativas, reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-17, interferon (IFN)- γ e IL-6 e atenuou o desenvolvimento de EAU (Yazid et al., 2015). Esses dados estimulam novas propostas de abordagens terapêuticas com AnxA1 em uveítes.

Diante do exposto e na busca de novas terapias para o tratamento da uveíte, substituindo as atuais que apresentam efeitos adversos (Read, 2006; Lee e Foster, 2010; Schwartzman, 2016), o estudo da administração do Ac2-26 peptídeo mimético, em uveítes autoimunes experimentais, utilizando protocolos de prevenção e terapêuticos, é importante, pois complementa as pesquisas de AnxA1 em processos inflamatórios oculares e pode levar a novas descobertas terapêuticas para o tratamento desta doença.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Ratos Lewis machos, com 6 a 8 semanas de idade (150 a 200g), foram obtidos da Unidade de Pesquisa Didática e Experimental (UDPE) do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva, SP, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes dos EUA (publicação do NIH nº 85-23, revisada em 1985) para experimentos com animais, as diretrizes para pesquisas biomédicas estabelecidas pelas Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental e foram aprovadas pelos Comitês de Ética em Uso de Animais na UNIFIPA (aprovação número 01/14). Além disso, todos os cuidados com o bem-estar dos animais foram prestados e os experimentos acompanhados por um veterinário do biotério da UNIFIPA.

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10/grupo): Controle sem manipulação (C), induzido a uveíte autoimune e não tratado (EAU), induzido a EAU e tratado preventivamente (P) ou terapêuticamente (T).

2.2 Modelo experimental de uveíte autoimune e protocolos de tratamento

Para o desenvolvimento da EAU, os animais foram inoculados na pata direita com 100 µg de proteína ligante de retinoides interfotorreceptores bovina (IRBP) em 100 µl de emulsão de adjuvante completo de Freund (adjuvante completo de Freund – CFA). Simultaneamente, uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo 0,5 µg da toxina de Bordetella pertussis purificada em 100 µl de PBS foi administrada como adjuvante adicional (Yadav et al., 2011; Fang et al., 2013).

A eficácia do tratamento com o peptídeo N-terminal Ac2-26 de AnxA1 (Ac-AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK) (Raynal e Pollard, 1994) foi testada administrando (ip) 200 µg do peptídeo em 200 µl de PBS (Girol et al., 2013; Girol et al., 2021) em dois grupos de EAU, segundo protocolos de prevenção ou terapêuticos, iniciados 24 horas após a indução. No protocolo de prevenção, os animais foram tratados diariamente, do dia 1 ao dia 13 pós-imunização. Os animais do protocolo terapêutico também receberam o peptídeo diariamente, mas do dia 8 ao dia 13 pós-imunização (Fang et al., 2013). Os animais EAU tratados ou não foram eutanasiados 14 dias após a imunização (Gasparin et al., 2012), devido a uma overdose de anestésico. Animais sem manipulação foram utilizados como grupo controle (Fig. 1).

2.3 Avaliação Clínica da EAU

A gravidade da EAU foi avaliada diariamente, desde o dia 2 pós-imunização até

o final do experimento, por meio de exame realizado com biomicroscópio. Cada olho foi classificado de acordo com os seguintes critérios de classificação: grau 0 (reflexo normal, vermelho e translúcido), grau 1 (dilatação dos vasos da íris e contração anormal da pupila), grau 2 (infiltrado celular, câmara anterior levemente opaca e diminuição do reflexo vermelho), grau 3 (câmara anterior moderadamente opaca, pupila ainda visível e reflexo vermelho muito diminuído) e grau 4 (câmara anterior opaca, pupila obscurecida e sem reflexo vermelho) (Yadav et al., 2011). Posteriormente, todos os olhos foram fotografados e interseções padronizadas de 3 mm foram adicionadas às fotografias e os vasos localizados nas interseções das linhas foram quantificados.

2.4 Análise histopatológica

2.4.1 Análise quantitativa de leucócitos no humor aquoso

O humor aquoso (AH) foi coletado por punção da câmara anterior do olho esquerdo e 10 μ l foram utilizados e corados em solução de Turk (90 μ l). Os leucócitos foram quantificados na câmara de Neubauer. Os valores para quantificação foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (S.E.M) do número de células $\times 10^5$ por ml.

Os olhos esquerdos, após a coleta de AH, foram fixados em formol a 10%, desidratados em ordem crescente de álcool e incluídos em parafina para estudo histopatológico e imuno-histoquímico.

2.4.2 Análise imuno-histoquímica

A detecção de AnxA1, fpr2, ciclooxigenase-2 (COX-2) e macrófagos em tecidos oculares foi realizada em cortes de 5 μ m dos olhos incluídos em parafina. A recuperação do antígeno foi realizada usando tampão citrato (pH 6,0) e as seções foram incubadas com anticorpos primários policlonais anti-AnxA1 (1:2000) de coelho (Life Technologies, EUA), anti-fpr2 (1:2000) (Bioss), anti COX-2 (1:1000) (Invitrogen) e anti-ED-1 monoclonal (macrófagos) (1:1000) (Merck, Millipore Corporation, EUA). Após a lavagem, o anticorpo secundário biotilado foi incubado (kit Histostain, Invitrogen), imerso em complexo conjugado com estreptavidina peroxidase e incubado em substrato diaminobenzidina (DAB), no escuro, para desenvolvimento (Kit DAB, Invitrogen). Em seguida, os cortes foram contracorados com Hematoxilina e as lâminas montadas.

As células ED-1 positivas foram quantificadas nas regiões anterior e posterior dos olhos usando o software Leica Image Analysis e os valores obtidos foram expressos como o número de células por mm^2 . Para a análise densitométrica de AnxA1, fpr2 e COX-2, foram analisados 15 pontos em 3 regiões dos processos ciliares e da retina para obter uma média relacionada à intensidade da imunocoloração. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (Girol et al., 2013).

2.5 Análise de proteínas em sobrenadantes de tecido ocular após maceração

Os olhos direitos intactos foram macerados em nitrogênio líquido e 500 µl de uma solução contendo inibidores de protease e fosfatase (Merck, Millipore Corporation, EUA) foram adicionados seguindo as instruções do fabricante. O material foi incubado por 20 minutos a 4°C sob agitação constante e depois centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -70°C.

A determinação da concentração de proteínas, presentes nos sobrenadantes dos tecidos oculares após maceração, foi realizada em ensaio de Bradford (Biorad, Hemel Hempsted, UK) e ajustada para 2 mg/ml. Uma alíquota foi misturada (1:1) com tampão de carregamento 2X (125 mM Tris base, pH 6,8, contendo 2 mM de ácido etilenodiamina tetraacético, 10% de mercaptoetanol, 4% de dodecil sulfato de sódio, 20% de glicerol, 0,1% de azul de Coomassie) e desnaturado em água a 100°C por 5 minutos. Amostras (20 µg de proteína por poço) e marcadores de peso molecular foram separados em gel SDS-PAGE (10% de dodecil sulfato de sódio – 10% de gel de poliacrilamida) e posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose. AnxA1, fpr2 e os linfócitos CD4+ e CD8+ foram detectados usando, respectivamente, anti-AnxA1 de coelho (1:1000) (Life Technologies, EUA), anti-fpr2 (1:2000) (Bioss), anti-cd4 (1:1000) (Abclonal - Abcam, Cambridge, MA, EUA) e anticorpos anti-cd8 (1:1000) (Abclonal - Abcam, Cambridge, MA, EUA). Os controles de reação foram realizados com anticorpo anti-tubulina-α (1:1000) (Sigma-Aldrich, EUA). O sinal foi amplificado usando anticorpos secundários IgG anti-coelho conjugados com HRP (Promega) e o produto da reação visualizado com coloração DAB (Kit DAB, Invitrogen). Para a análise densitométrica, AnxA1, fpr2, CD4+ e CD8+ foram quantificados usando o *software Leica Image Analysis*

2.6 Análise quantitativa dos níveis de citocinas

As citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (Yadav et al., 2011; Guedes, Borrego e Proença, 2016) foram quantificados no sobrenadante dos olhos usando o kit MILLIPLEX MAP de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; Millipore Corporation, EUA) e analisados no equipamento LUMINEX xMAP MAGPIX (Millipore Corporation, EUA) e foram seguidas todas as instruções do fabricante..

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram previamente submetidos à análise descritiva e determinação da normalidade. Como as amostras apresentaram distribuição normal, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Todos os valores obtidos foram expressos como média ± S.E.M. e valores de P menores que 0,05 foram

considerados estatisticamente significantes.

3 | RESULTADOS

3.1 Avaliação Clínica da EAU

Inicialmente, realizamos as análises clínicas por meio de um biomicroscópio para avaliar a evolução do grau de gravidade da doença após a indução. Nossos resultados mostraram olhos controle com vascularização normal, tamanho da pupila dentro dos parâmetros indicados e transparência da câmara anterior (Fig. 2A). Em contraste, os olhos de camundongos induzidos com IRBP + toxina purificada de *Bordetella pertussis* mostraram um aumento no número de vasos sanguíneos, dilatação vascular iridiana, vermelhidão, pupila obscurecida, maior opacidade na câmara anterior, reflexo vermelho diminuído e conjuntiva inchada (Fig. 2B-D). Nos grupos tratados (Fig. 2E-J), a vascularização, o tamanho da pupila e a transparência na câmara anterior foram restabelecidos aos parâmetros normais, observando-se maior similaridade do grupo preventivo em relação aos animais controle.

O escore clínico confirmou estatisticamente as análises biomicroscópicas, indicando diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e EAU ($p < 0,001$). O tratamento com o peptídeo Ac2-26 reduziu a gravidade clínica da EAU no dia 14, principalmente nos animais tratados preventivamente ($p < 0,05$) (Fig. 2K). A quantificação de vasos mostrou um aumento, embora não significativo, no grupo EAU não tratado em relação aos demais grupos (Fig. 2L).

3.2 Tratamentos preventivos e terapêuticos reduzem o influxo de leucócitos na EAU

As análises histopatológicas por HE mostraram infiltração de células inflamatórias nos segmentos anterior e posterior dos olhos dos animais EAU (Fig. 3B e F). Observou-se que as células transmigraram para os tecidos, especialmente a retina e o corpo ciliar. Os animais de controle não apresentaram influxo de leucócitos (Fig. 3A e E). Os tratamentos, tanto preventivos (Fig. 3C e G) quanto terapêuticos (Fig. 3D e H), promoveram a redução da infiltração leucocitária nos tecidos oculares.

A análise quantitativa de AH mostrou um grande número de leucócitos no grupo induzido a EAU sem tratamento, mas uma redução significativa de linfócitos ($p < 0,001$) foi observada com a administração de Ac2-26 em ambos os protocolos de tratamento (Fig. 3I, J e K). No grupo tratado terapêuticamente, monócitos e neutrófilos também diminuíram ($p < 0,001$).

Para complementar esses dados, macrófagos também foram quantificados, após

imuno-histoquímica (Fig. 4A e B). Essas análises indicaram maior número de macrófagos em EAU não tratada ($p < 0,001$) e animais tratados preventivamente com o peptídeo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O tratamento terapêutico reduziu o número de macrófagos em relação ao grupo induzido à EAU ($p < 0,01$) (Fig. 4B).

Além disso, a expressão de CD4+ e CD8+ foi verificada no sobrenadante do macerado ocular. Esta análise indicou aumento de CD4+ e CD8+ no grupo EAU não tratado, mas mostrou redução de CD4+ em ambos os grupos tratados, principalmente no protocolo terapêuticamente, no qual CD8+ também foram diminuídos (Fig. 3D e E). CD4+ e CD8+ não foram detectados no grupo controle (Fig. 4C, D e E).

3.3 A administração do peptídeo Ac2-26 modula as expressões AnxA1 e fpr2

A expressão da AnxA1 foi observada nos processos ciliares e retina de ratos do grupo controle (Fig. 5A e E). A análise densitométrica revelou expressão aumentada de AnxA1 nessas regiões no grupo EAU não tratado ($p < 0,001$) (Fig. 5B, F e J). No entanto, a expressão reduzida de AnxA1 foi encontrada em animais EAU tratados preventivamente ($p < 0,001$) (Fig. 5C, G e J) e terapêuticamente ($p < 0,001$) (Fig. 5D, H e J) com o peptídeo Ac2-26.

O receptor fpr2 foi expresso nas mesmas regiões onde AnxA1 foi observado (Fig. 6A-H). A expressão de fpr2 ocorreu em células epiteliais dos processos ciliares e retina dos animais EAU e em camundongos tratados com Ac2-26 (Fig. 6). A análise densitométrica revelou aumento da imunoreatividade no grupo EAU ($p < 0,001$) e, embora ainda elevada, houve diminuição em ambos os grupos tratados, sendo mais pronunciada no tratamento preventivo (P: $p < 0,001$ e T: $p < 0,01$) (Fig. 6J). A especificidade da imunocoloração foi confirmada por controles de reação (Fig. 5 e 6I).

A análise de Western blotting da expressão do receptor AnxA1 e fpr2 em sobrenadantes do tecido ocular após maceração (Fig. 7A) reforçou os achados imuno-histoquímicos. As análises densitométricas indicaram aumento da expressão de AnxA1, nas formas intacta e clivada N-terminal, no grupo EAU ($p < 0,001$), mas o tratamento com Ac2-26 reduziu significativamente os níveis da forma intacta de AnxA1 no preventivo ($p < 0,01$) e grupos tratados terapêuticos ($p < 0,001$) (Fig. 7B). A expressão de fpr2 continuou a ser aumentada após o tratamento com Ac2-26, em comparação ao controle, no entanto, foi reduzido no grupo preventivo em comparação com o EAU não tratado ($p < 0,05$) (Fig. 7C).

3.4 Os tratamentos inibem a liberação de mediadores inflamatórios

A expressão de COX-2 foi detectada por imuno-histoquímica nos segmentos oculares anterior e posterior (Fig. 8A-H). A análise densitométrica indicou um aumento na imunoreatividade de COX-2 em EAU ($p < 0,001$) em comparação com animais de

controle (Fig. 8J). O tratamento com a administração do peptídeo reduziu a expressão desta enzima nos tecidos oculares nos grupos tratados preventivos ($p<0,05$) (Fig. 8C, G e J) e terapêuticos ($p<0,001$) (Fig. 8D, H e J).

Níveis elevados de IL-2 ($p<0,001$), IFN- γ ($p<0,05$), IL-10 ($p<0,001$) e MCP-1 ($p<0,01$) foram observados no sobrenadante macerado do olho de animais EAU (Fig. 9A, C, G e E). A administração do peptídeo promoveu redução significativa dos mediadores pró-inflamatórios IL-2 (P: $p<0,05$) e IFN- γ (P: $p<0,001$ e T: $p<0,05$) (Fig. 9A e C). Também houve redução da citocina anti-inflamatória IL-10 ($p<0,05$) no grupo tratado terapeuticamente (Fig. 9G).

4 | DISCUSSÃO

Caracterizada como uma inflamação da camada vascular média do olho, a uveíte é uma das causas mais comuns de deficiência visual e cegueira em todo o mundo (Yadav et al., 2011; Zhong et al.2020). Devido ao papel da proteína AnxA1 nos processos inflamatórios oculares, no presente estudo, analisamos in vivo, no modelo EAU, os efeitos anti-inflamatórios da administração de Ac2-26, em protocolos de tratamento preventivo e terapêutico.

Inicialmente, verificamos o grau de gravidade da doença em EAU por meio de análises clínicas e nossos resultados mostraram que os olhos dos ratos induzidos apresentavam vascularização aumentada, vermelhidão, pupila obscurecida, opacidade intensa da câmara anterior e reflexo vermelho reduzido. Nos grupos tratados, as características oculares assemelharam-se aos critérios normais, principalmente no grupo preventivo. O resultado obtido corrobora outro estudo em que, após imunização com IRBP, ratos apresentaram grave desenvolvimento de EAU, com opacidade visível na câmara anterior, obscurecimento da pupila, lesão da camada fotorreceptora e infiltração leucocitária grave na câmara posterior (Fang et al., 2013). Além disso, os efeitos benéficos do tratamento com hrAnx-A1 por um período mais longo foram observados no modelo EAU de camundongos AnxA -/-. O hrAnx-A1 impediu o desenvolvimento da EAU limitando o desenvolvimento de Th17 (Yazid et al., 2015).

Os estudos histopatológicos e quantitativos das células leucocitárias mostraram maior número de linfócitos, mas também neutrófilos e monócitos no grupo induzido por EAU, sendo que essas células foram observadas principalmente na retina e corpo ciliar. Entretanto, a administração de Ac2-26 promoveu redução do influxo inflamatório no grupo preventivo e principalmente terapêutico. Por Western blotting, o aumento da expressão de linfócitos CD4+ e CD8+ também foi observado no sobrenadante macerado ocular de animais EAU não tratados, sendo reduzido em ambos os grupos tratados com o peptídeo mimético AnxA1.

Na EAU, a resposta inflamatória é desencadeada por linfócitos, principalmente

CD4+, com polarização dos linfócitos T auxiliares (Th)0 para o perfil Th1 e Th17 (Gasparin et al., 2012; Guedes, Borrego e Proença, 2016). Este aumento de leucócitos é consistente com outras pesquisas, relacionadas à resposta inflamatória em EAU, usando camundongos AnxA1-/-, com aumento da gravidade da doença e infiltração de células inflamatórias, em particular, linfócitos Th17-CD4+ (Yazid et al., 2015). Ainda no modelo EAU, houve redução nas células CD4+ autorreativas e nos níveis de IL-17, IFN- γ e IL-6 pela administração sistêmica diária de hrAnx-A1 (Gardner et al., 2017).

De acordo com nossos achados em subpopulações de linfócitos, Fan e colaboradores (2021) observaram infiltração de células Th17 na retina na forma crônica de uveíte autoimune, caracterizadas como células CD44hiIL-17+CD4+ de memória Th17 predominantes, sugerindo que essas células podem levar à inflamação intraocular crônica. Outro estudo investigou o tratamento com glicosídeos totais de *Paeonia* (TGP) em camundongos induzidos por EAU. A citometria de fluxo demonstrou diminuição das concentrações de CD4+ e do perfil de CD4+/CD8+ e IFN- γ , bem como aumento da frequência de CD8+ no baço e linfonodos, atuando como imunomodulador (Huang et al., 2018).

Em outra condição de inflamação ocular previamente estudada por nosso grupo de pesquisa, a uveíte induzida por endotoxina (EIU), o influxo de células leucocitárias é caracterizado principalmente por neutrófilos, e a transmigração dessas células ocorre na base do corpo ciliar, enquanto o infiltrado de células mononucleares fagocíticas e linfócitos ocorrem nos vasos da íris (Silva, Girol e Oliani, 2011; Girol et al., 2013; Girol et al., 2021). Na presente investigação, a quantificação tecidual por imuno-histoquímica mostrou maior número de macrófagos na retina, estendendo-se até o corpo ciliar no EAU em comparação aos grupos controle e tratado. Outros estudos indicaram que os macrófagos desempenham um papel crucial na EAU, especialmente em relação à fase de indução e eficácia no estabelecimento da doença (Jiang, Lumsden e Forrester, 1999; Mérida et al., 2015). Investigações reforçam que macrófagos derivados de um tipo específico de monócitos são previamente recrutados durante o progresso e indução de EAU, exibindo um fenótipo pró-inflamatório. A inibição do infiltrado inflamatório contendo essas células previne a inflamação oftalmológica (London et al. 2013).

Seguindo nossos estudos, analisamos as expressões de diferentes proteínas envolvidas em processos inflamatórios. A imunomarcagem para AnxA1 e fpr2 foi intensamente observada nos processos ciliares e retina de ratos do grupo induzido por EAU, o que reforça a participação desta proteína na inflamação e sua interação com fpr2. Em um modelo de conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina, a colocalização ultraestrutural de fpr2/AnxA1 foi observada na membrana plasmática de mastócitos, eosinófilos e neutrófilos, e os efeitos benéficos da administração do peptídeo foram revertidos por Boc2, um antagonista de fpr. Os autores indicam o sistema AnxA1/fpr como alvo terapêutico em distúrbios oculares (Marmorato et al., 2019).

A expressão aumentada da proteína AnxA1 endógena também ocorreu na retina no pico da doença EAU em camundongos C57BL/6 (d26), com os níveis de proteína parecendo aumentar na camada de células ganglionares (Gardner et al., 2017). Além disso, nossos resultados complementam outros estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa que mostraram um aumento da imunorreatividade AnxA1 em todas as regiões oculares em EIU e interação com fpr2 para resolução do processo inflamatório (Girol et al., 2013; Girol et al., 2021).

No entanto, essas investigações em EIU mostraram um aumento na expressão de fpr2 pela administração do peptídeo Ac2-26. Diferentemente, no presente estudo, embora a administração de Ac2-26 na EAU tenha mantido a expressão de fpr2 aumentada em relação ao grupo controle, houve redução em relação à EAU não tratada. Está estabelecido que FPR1/FPR2 medeia sinais AnxA1 para regular a inflamação (Dufton et al., 2010), assim como a translocação do complexo ligante-receptor para o citoplasma é fundamental para a ativação funcional da interação de sinalização dependente de AnxA1/FPR2 (Maderna et al., 2010). Além disso, na EIU, as observações foram realizadas às 24 e 48 horas (Girol et al., 2013; Girol et al., 2021), enquanto na EAU, as análises foram realizadas 14 dias após a indução.

Nossa investigação complementa as descobertas de Gardner e colegas (2017) que indicaram a relevância de AnxA1 na retina humana e a eficácia do tratamento com hrAnxA1 em um modelo EAU com camundongos AnxA^{-/-}. Além disso, esses autores mostraram a expressão dos receptores FPR1 e FPR2 na retina humana e relataram que a presença desses receptores em astrócitos, microglia e células de Muller levou à modulação da inflamação do tecido retiniano pelo hrAnxA1, por meio da diminuição das citocinas.

Em relação aos mediadores pró-inflamatórios, procedeu-se à análise da expressão de COX-2 no olho. Maior imunocoloração da enzima foi observada em animais não tratados com EAU em comparação com controles e tratados. Um estudo que utilizou um inibidor de COX-2 (CS 236) antes da indução com antígeno, associado à melanina, mostrou que ratos Lewis não desenvolveram uveíte anterior autoimune experimental (EAAU), mas os animais dos grupos que tinham apenas DMSO como veículo, apresentou maior gravidade desta inflamação ocular (Yadav et al., 2011). Mais uma vez, os resultados obtidos indicam os efeitos protetores dos tratamentos com o peptídeo Ac2-26, por reduzir a imunorreatividade para COX-2 e são semelhantes ao efeito anti-inflamatório do peptídeo em modelo de uveíte infecciosa (Girol et al., 2013; Girol et al. 2021).

Em seguida, analisamos mediadores inflamatórios no sobrenadante do macerado ocular. Níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ , do anti-inflamatório IL-10 e da quimiocina MCP-1 foram encontrados no grupo EAU não tratado. Mas nossos resultados indicam efeitos benéficos da administração de Ac2-26 tanto preventiva quanto terapeuticamente através da redução de IL-2, IL10 e IFN- γ .

A EAU é mediada predominantemente por linfócitos T CD4⁺ e citocinas pró-

inflamatórias (Witkowski et al., 2016). As células Th são diferenciadas das células T CD4+ virgens e regulam as respostas inflamatórias e a imunidade geral. Embora a patogênese da uveíte autoimune humana não seja totalmente compreendida, a associação entre o desenvolvimento da uveíte e as respostas das células Th foi estabelecida como um contribuinte vital para a etiologia da uveíte autoimune (Luger et al, 2014, Niu et al., 2019). Além disso, a diferenciação e ativação de subconjuntos de células Th pró-inflamatórias, incluindo Th1 e Th17, demonstraram induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias que são capazes de romper a barreira sanguínea da retina. Essas citocinas pró-inflamatórias recrutam macrófagos, resultando em inflamação intraocular (Lee et al., 2014).

Subconjuntos de células podem agir de forma antagonista (Luger et al., 2014). Por exemplo, deficiência ou neutralização de INF- γ , a citocina reguladora primária para Th1, resulta em elevação de Th17 e vice-versa (Yi et al., 2008). A expressão de Notch1, IL-10 e IL-17 no baço, linfonodos e tecidos oculares foi aumentada em EAU em ratos, assim como as razões regulatórias CD4+/CD8+ e Th17/T (Treg) em comparação com indivíduos normais (Yin e outros, 2019).

As relações celulares no desenvolvimento da uveíte são complexas. A IL-2 promove o desenvolvimento de células Treg e pode conferir proteção contra doenças autoimunes (Malek, 2008). Curiosamente, por um lado, a IL-2 inibe a diferenciação de células Th17, embora, por outro lado, induza a expansão de células Th17, que uma vez desenvolvidas, mediam a uveíte (Amadi-Obi et al, 2007). A inflamação no olho pode ser controlada pela infiltração de células produtoras de citocinas supressoras como IL-10 ou por células da retina e citocinas produzidas endogenamente. As células T intraoculares que co-produzem INF- γ , IL-17 e IL-10 foram mostradas em EAU de camundongo (Wildner e Möhring 2019).

Entre as citocinas examinadas por seu papel funcional na uveíte e sua relação com células Th17 patológicas, destacam-se IL-6, IL-10, IL-17, IL-22, IL-23 e TNF- α (Weinstein e Pepple, 2019). Enquanto IL-1 β e TNF- α aumentam a produção de quimiocinas, citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β e também IL-6 tiveram pouco efeito na produção de quimiocinas na retina humana (Wildner e Möhring 2019; Thomas, 2019). A IL-17 está intimamente associada à uveíte, enquanto a IL-10 está negativamente correlacionada com a uveíte (Zhou et al., 2012).

Curiosamente, nossos resultados também apontam para a redução de IL-10 com a administração do peptídeo Ac2-26 de AnxA1, o que pode reforçar a resolução do processo inflamatório. Estudos in vitro com culturas de linfócitos T de camundongos tratados com hrAnxA1 mostraram níveis reduzidos de IL-10 (D'Acquisto et al. 2008). Além disso, no modelo de conjuntivite alérgica, foram observados baixos níveis de IL-10 após o tratamento com Ac2-26, bem como um aumento significativo dessa citocina em animais AnxA1-/- (Gimenes et al., 2015), indicando a importância do equilíbrio Th1/Th2 no desenvolvimento de respostas inflamatórias alérgicas e sugerindo que o papel protetor da AnxA1 na alergia ocular ocorre através da regulação negativa de ambos os perfis de citocinas.

Os níveis de IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , INF- γ foram aumentados em um modelo EAU com camundongos AnxA1-/- (Yazid et al., 2015). No entanto, a administração de hrAnxA1 exógeno reduziu as respostas de Th17. Esses autores demonstram que a deficiência de AnxA1 resulta em aumento da patologia autoimune em camundongos, com maior número de retina Th17 e níveis elevados de IL-17 na periferia. Portanto, nossos resultados complementam esses estudos anteriores e mostram que o tratamento preventivo e terapêutico com o peptídeo Ac2-26 também são eficazes no controle da EAU com perspectivas clínicas interessantes.

5 | CONCLUSÃO

Juntos, nossos resultados enfatizam o envolvimento de AnxA1 e seu peptídeo mimético Ac2-26, por meio da interação AnxA1/fpr2, na resolução da inflamação ocular autoimune, e demonstram a potencial aplicação do peptídeo Ac2-26, especialmente na terapia tratamento.

REFERÊNCIAS

- Amadi-Obi, A., Yu, C., Liu, X., Mahdi, R. M., Clarke, G. L., Nussenblatt, R. B., Gery, I., Lee, Y. S., Egwuagu, C. E. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med.* 2007, 13(6):711–718.
- Babu, B. M.; Rathinam, S. R. Intermediate uveitis. *Indian J Ophthalmol*, Jan-Feb 2010;58(1):21-7. doi:10.4103/0301-4738.58469.
- Bansal, R.; Gupta, V.; Gupta, A. Current approach in the diagnosis and management of panuveitis. *Indian J Ophthalmol*, an-Feb 2010;58(1):45-54. doi:10.4103/0301-4738.58471.
- Cardin, L. T., Sonehara, N. M., Mimura, K. K. O., Santos, A. R. D., Junior, W. A. S., Sobral, L. M., Leopoldino, A. M., Cunha, B. R., Tajara, E. H., Oliani, S. M., Rodrigues-Lisoni, F. C. ANXA1 Ac2-26 peptide, a possible therapeutic approach in inflammatory ocular diseases. *Gene*, 2017 May 30;614:26-36.
- D'Acquisto, F. On the adaptive nature of annexin-A1. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Aug;9(4):521-8.
- Da Silva, P. S.; Girol, A. P.; Oliani, S. M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. *Molecular Vision*, 2011;17:1310-9.
- Da Silva, R.A., Hamade, A. M. A., Silva, G. A. S., Pereira, G. H., De Oliveira, F. F. J., Costa, S. S., Iyomasa-Pilon, M. M., Souza, R. H., Possebon, L., Girol, A. P. Evaluation of Annexin A1 Protein in an Infectious Keratitis Model: Therapeutic Perspectives. *Current Trends in Ophthalmology*, v. 2, n. 1, 2019. doi.org/10.18314/ctoy.v2i1.1478.
- Egwuagu, C. E.; Larkin Iii, J. Therapeutic targeting of STAT pathways in CNS autoimmune diseases. *JAKSTAT*, 2013 Jan 1;2(1):e24134.
- Fan, N-W., Li, J., Mittal, S. K., Foulsham, W., Elbasiony, E., Huckfeldt, R. M., Chauhan, S. K., Chen, Y. Characterization of Clinical and Immune Responses in an Experimental Chronic Autoimmune Uveitis Model. *Am J Pathol.* 2021 Mar;191(3):425-437.

- Fang, C-B., Zhou, D-X., Zhan, S-X., He, Y., Lin, Z., Huang, C., Li, J. Amelioration of experimental autoimmune uveitis by leflunomide in Lewis rats. *PLoS One*, 2013 Apr 23;8(4):e62071.
- Forrester, J.V., Kuffova, L., Dick, A.D. Autoimmunity, Autoinflammation, and Infection in Uveitis. *Am J Ophthalmol*, 2018 May;189:77-85.
- Gardner, P.J., Yazid, S., Ribeiro, J., Ali, R.R., Andrew, D. Augmenting Endogenous Levels of Retinal Annexin A1 Suppresses Uveitis in Mice. *Transl Vis Sci Technol*, 2017 Oct 5;6(5):10.
- Gasparin, F., Takahashi, B. S., Scolari, M. R., Gasparin, F., Pedral, L. S., Damico, F. M. Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. *Arq Bras Oftalmol*, Mar-Apr 2012;75(2):143-7.
- 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*. 2009 Jan;174(1):177-83.
- Gastardelo, T. S., Cunha, B. R., Raposo, L. S., Maniglia, J. V., Cury, P. M., Rodrigues-Lisoni, F. C., Tajara, E. H., Oliani, S. M. Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014 Dec 9;9(12):e111317.
- Gavins, F. N. E., Dalli, J., Flower, R. J., Granger, D. N., Perretti, M. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *FASEB J*, 2007 Jun;21(8):1751-8.
- Gimenes A. D., Andrade, T.R.M., Mello, C.B., Ramos, L., Gil, C.D., Oliani, S.M. Beneficial effect of annexin A1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. *Exp Eye Res*. 2015 May;134:24-32.
- Girol, A. P., Mimura, K. K. O., Drewes, C. C., Bolonheis, S. M., Solito, E., Farsky, S. H. P., 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*, 2013 Jun 1;190(11):5689-701.
- Girol, A.P., Zanon, C. F., Caruso, Í.P., Costa, S. S., Souza, H. R. Cornélio, M. L. Oliani, S. M. Annexin A1 Mimetic Peptide and Piperlongumine: Anti-Inflammatory Profiles in Endotoxin-Induced Uveitis. *Cells*, 2021 Nov 15;10(11):3170.
- Guedes, M. C. E; Borrego, L. M; Proença, R. D. Roles of interleukin17 in uveitis. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2016. 64 (9): 628-634.
- Han, P. F., Che, X-D., Li, H-Z., Gao, Y. Y., Wei, X-C., Li, P-C. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. *Chin J Traumatol*. 2020 Apr;23(2):96-101.
- Heiligenhaus, A., Thureau, S., Hennig, M., Grajewski, R. S., Wildner, G. Anti-inflammatory treatment of uveitis with biologicals: new treatment options that reflect pathogenetic knowledge of the disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010 Nov;248(11):1531-51.
- Huang, X-T., Wang, B., Zhang, W-H., Peng M-Q., Lin, D. Total glucosides of paeony suppresses experimental autoimmune uveitis in association with inhibition of Th1 and Th2 cell function in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018 Jan-Feb; 31: 039463201775154
- Jiang, H. R; Lumsden, L; Forrester, J. V. Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10RIII mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Dec;40(13):3177-85.

- Jancevski, M.; Foster, C. Cataracts and uveitis. *Curr Opin Ophthalmol*, v. 21, n. 1, p. 10-4, Jan 2010.
- Lee, F.; Foster, C. S. Pharmacotherapy of uveitis. *Expert Opin Pharmacother*, 2010 May;11(7):1135-46.
- Lee, R.W., Nicholson, L. B., Sen, H. N., Chan, C-C., Wei, L., Nussenblatt, R. B., Dick, A. D. Autoimmune and autoinflammatory mechanisms in uveitis. *Semin Immunopathol*. 2014;36:581–94.
- Li, X., Gao, Q., Yang, L., Han, M., Zhou, C., Mu, H. Matairesinol ameliorates experimental autoimmune uveitis by suppression of IRBP-specific Th17 cells. *J Neuroimmunol*. 2020; 345: 577286.
- Lim, L.; Pervaiz, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*, 2007 Apr;21(4):968-75.
- Lizarbe, M. A., Barrasa, J. I., Olmo, N., Gavilanes, F., Turnay, J. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *Int J Mol Sci*, 2013 Jan 28;14(2):2652-83.
- London, A., Benhar, I., Mattapallil, M. J., Mack, M., Caspi, R. R., Schwartz, M. Functional macrophage heterogeneity in a mouse model of autoimmune central nervous system pathology. *J Immunol*. 2013 Apr 1;190(7):3570-8. doi: 10.4049/jimmunol.1202076.
- Luger D., Silver, B. P., Tang, J., Cua, D., Chen, Z., Iwakura, Y., Bowman, E. P., Sgambellone, N. M., Chan, C-C., Caspi, R. R. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med*. 2008;205:799–810.
- Maderna, P., Cottell, D. C., Toivonen, T., Dufton, N., Dalli, J., Perretti, M., Godson, C. FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. *FASEB J*, 2010 Nov;24(11):4240-9.
- Marmorato, M.P., Gimenes, A.D., Andrade, F.E.C., Oliani, S.M., Gil, C.D. Involvement of the annexin A1-Fpr anti-inflammatory system in the ocular allergy. *European Journal of Pharmacology*, 2019 Jan 5;842:298-305.
- Malek, T.R. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*. 2008, 26:453–479.
- Mérida, S., Palacios, E., Navea, A., Bosch-Morel, F. Macrophages and Uveitis in Experimental Animal Models. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:671417.
- Mimura, K. K., Tedesco, R.C., Calabrese, K.S., Gil, C.D., Oliani, S.M. The involvement of anti-inflammatory protein, annexin A1, in ocular toxoplasmosis. *Mol Vis*, 2012;18:1583-93.
- Munn, T. Z., Mues, G. Human lipocortin similar to ras gene products. *Nature*, 1986 Jul 24-30;322(6077):314-5.
- Niu, T., Cheng, L., Wang, H., Zhu, S., Yang, X., Lui, K., Jin, H., X, X. KS23, a novel peptide derived from adiponectin, inhibits retinal inflammation and downregulates the proportions of Th1 and Th17 cells during experimental autoimmune uveitis. *J Neuroinflammation*, 2019 Dec 28;16(1):278.
- Ooi, K. G-J., Galatowicz, G., Clader, V. L., Lightman, S. L. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res*, 2006 Dec;4(4):294-309.
- Pasadhika, S., Rosenbaum, J. T. Update on the use of systemic biologic agents in the treatment of noninfectious uveitis. *Biologics*, 2014 Feb 15;8:67-81.

- Patel, H. B., Kornerup, K. N., Sampaio, A. L. F., D'Acquisto, F., Seed, M. P., Girol, A. P., Gray, M., Pitzalis, C., Oliani, S. M., Perretti, M. The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2012 Nov;71(11):1872-80.
- Perretti, M.; D'acquisto, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2009 Jan;9(1):62-70.
- Raynal, P.; Pollard, H. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1197, n. 1, p. 63-93, Apr 1994. ISSN 0006-3002.
- Read, R. W. Uveitis: advances in understanding of pathogenesis and treatment. *Curr Rheumatol Rep*, 2006 Aug;8(4):260-6.
- Rong, H., Shen, H., Xu, Y., Yang, H. Notch signaling suppresses regulatory T cell function in murine experimental autoimmune uveitis. *Immunology*, 2016 Dec;149(4):447-459.
- Rosenbaum, J. T. Future for biological therapy for uveitis. *Curr Opin Ophthalmol*, 2010 Nov;21(6):473-7.
- Silva, P.S.; Girol, A. P.; Oliani, S. M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis*, 2011;17:1310-9.
- Sinniah, A., Yazid, S., Bena, S., Oliani, S.M., Perretti, M., Flower, R.J. Endogenous Annexin-A1 Negatively Regulates Mast Cell-Mediated Allergic Reactions. *Frontiers in Pharmacology*, 2019 Nov 13;10:1313.
- Sugimoto M.A, Vago J.P, Teixeira M.M, Sousa L.P. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *Journal of Immunology Research*, 2016;2016:8239258.
- Srivastava, A.; Rajappa, M.; Kaur, J. Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. *Clin Chim Acta*, 2010 Sep 6;411(17-18):1165-71.
- Schwartzman S. Advancements in the management of uveitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2016 Apr;30(2):304-315. doi: 10.1016/j.berh.2016.07.005.
- Tang, K., Guo, D., Zhang, L., Guo, J., Zheng, F., Si, J., Bi, H. Immunomodulatory effects of Longdan Xiegan Tang on CD4+/CD8+ T cells and associated inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune uveitis. *Mol Med Rep*. 2016 Sep;14(3):2746-54.
- Thomas, A.S. Biologics for the treatment of noninfectious uveitis: current concepts and emerging therapeutics. *Curr Opin Ophthalmol*. 2019; 30(3):138–50.
- Wildner, G.; Diedrichs-Möhring, M. Resolution of Uveitis. *Semin Immunopathol*. 2019 Nov;41(6):727-736.
- Witkowski, L., Cywinska, A., Paschalis-Trela, K., Crisman, M., Kita, J. Multiple etiologies of equine recurrent uveitis - A natural model for human autoimmune uveitis: A brief review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 2016 Feb;44:14-20.
- Weinstein, J.E.; Pepple, K.L. Cytokines in uveitis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2018;29(3):267–74.

Yadav, U. C., Shoeb, M., Srivastava, S. K., Ramana, K. V. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by aldose reductase inhibition in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011 Oct 11;52(11):8033-41.

Yang, H., Zheng, S., Mao, Y., Chen, Z., Zheng, C., Li, H., Sumners, C., Li, Q., Yang, P., Lei, B. Modulating of ocular inflammation with macrophage migration inhibitory factor is associated with notch signalling in experimental autoimmune uveitis. *Clin Exp Immunol*, 2016 Feb;183(2):280-93.

Yazid, S., Gardner, P. J., Carvalho, L., Chu, C. J., Flower, R. J., Solito, E., Lee, R. W. J., Ali, R. R., Dick, A. D. Annexin-A1 restricts Th17 cells and attenuates the severity of autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity*, 2015 Apr;58:1-11. doi: 10.1016/j.jaut.2014.12.004.

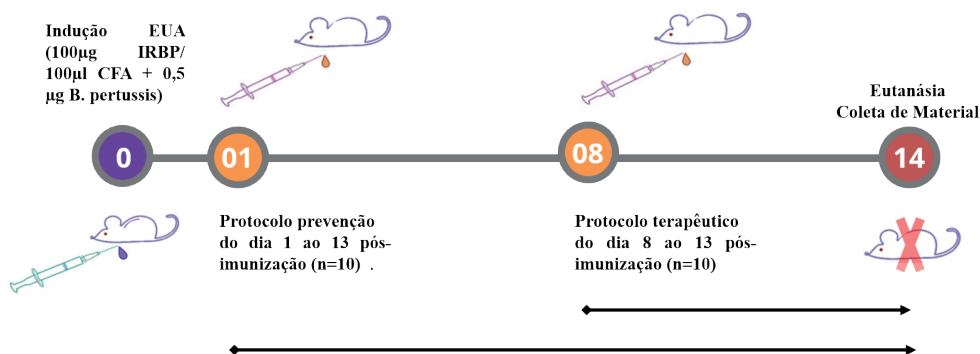
Yi, T., Zhao, D., Lin, C-L., Zhang, C., Chen, Y., Todorov, I., Lebon, T., Xu, F., Liu, T., Bi, H., Guo, D. Activation of the Notch Signaling Pathway Disturbs the CD4⁺/CD8⁺, Th17/Treg Balance in Rats With Experimental Autoimmune Uveitis. *Inflamm Res*. 2019 Sep;68(9):761-774.

Zhong, Z., Su, G., Kijlstra, A., Yang, P. Activation of the interleukin-23/interleukin-17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis. *Prog Retin Eye Res*. 2020 May 16;100866.

Zhou, Z.Y., Chen, S. L., Shen, N., Lu, Y. Cytokines and Behcet's disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):699-704.

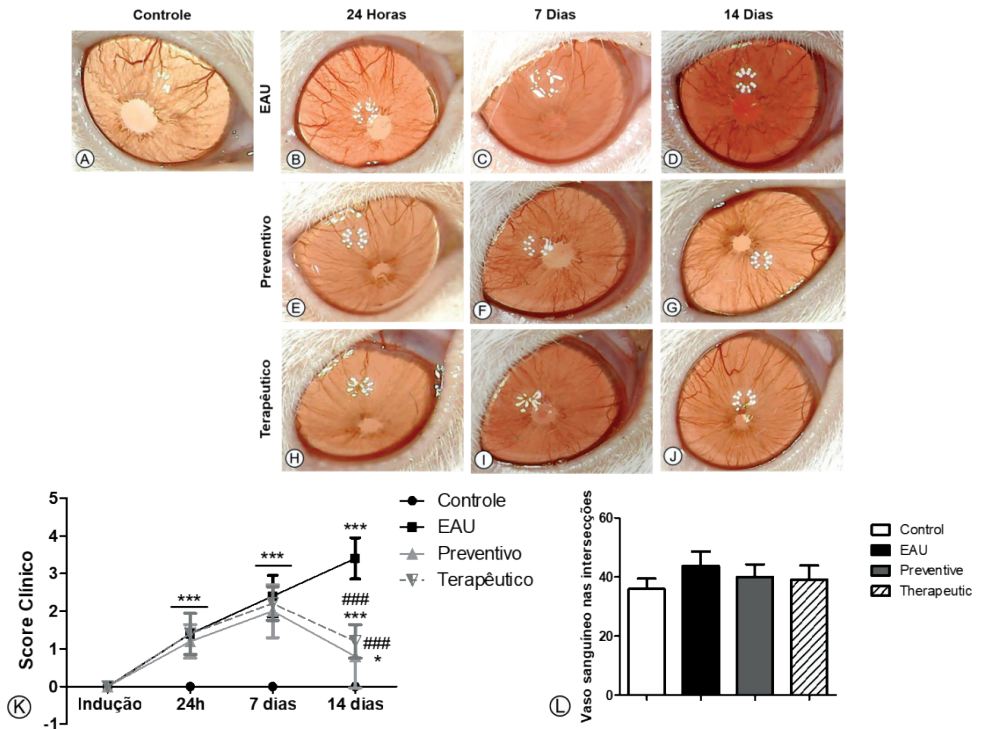
Figuras

Fig. 1. Representação esquemática dos grupos experimentais. Induzida por 100µg IRBP/ 100µl CFA + 0,5 µg B. pertussis. Protocolo preventivo e terapêutico, 200 µg de peptídeo em 200 µl de PBS.



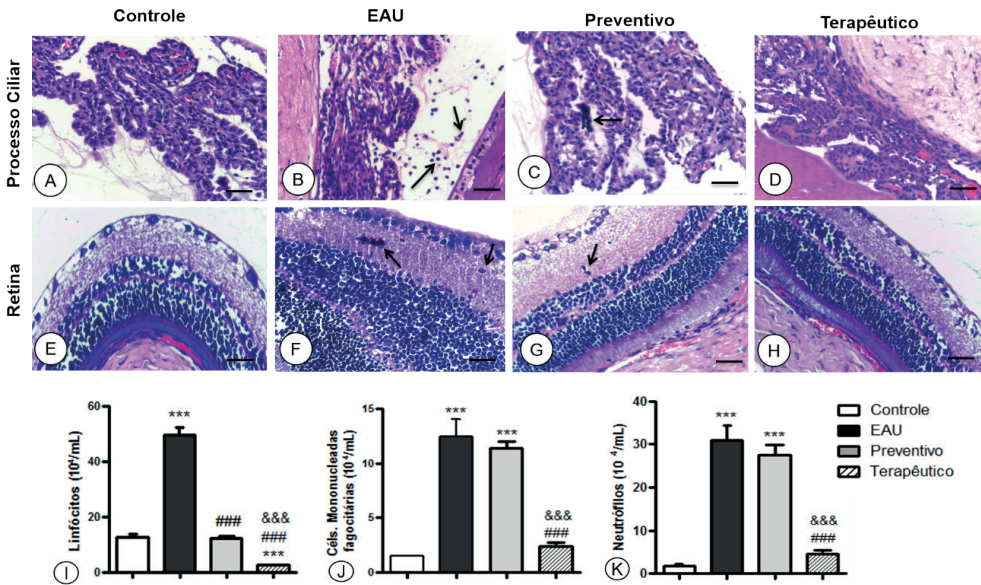
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 2. Análise clínica por biomicroscopia. Após 24 horas da indução da EAU (B), a câmara anterior está levemente opaca. O reflexo vermelho (dos vasos) diminui após 7 dias (C). Aos 14 dias a câmara anterior está moderadamente opaca, a pupila ainda visível, o reflexo vermelho (dos vasos) está diminuído e o vermelhidão intensa está presente (D). Grupo preventivo (E, F, G) e grupo terapêutico (H, I, J) apresentam características clínicas semelhantes ao grupo controle (A). **Score Clínico.** Exame dos olhos ao longo da doença (K). Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.E.M., *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ vs Controle; ### $p < 0,001$ vs EAU. **Análise de quantificação de vasos sanguíneos oculares.** Resultados apresentados como média $\pm$ S.E.M (L).



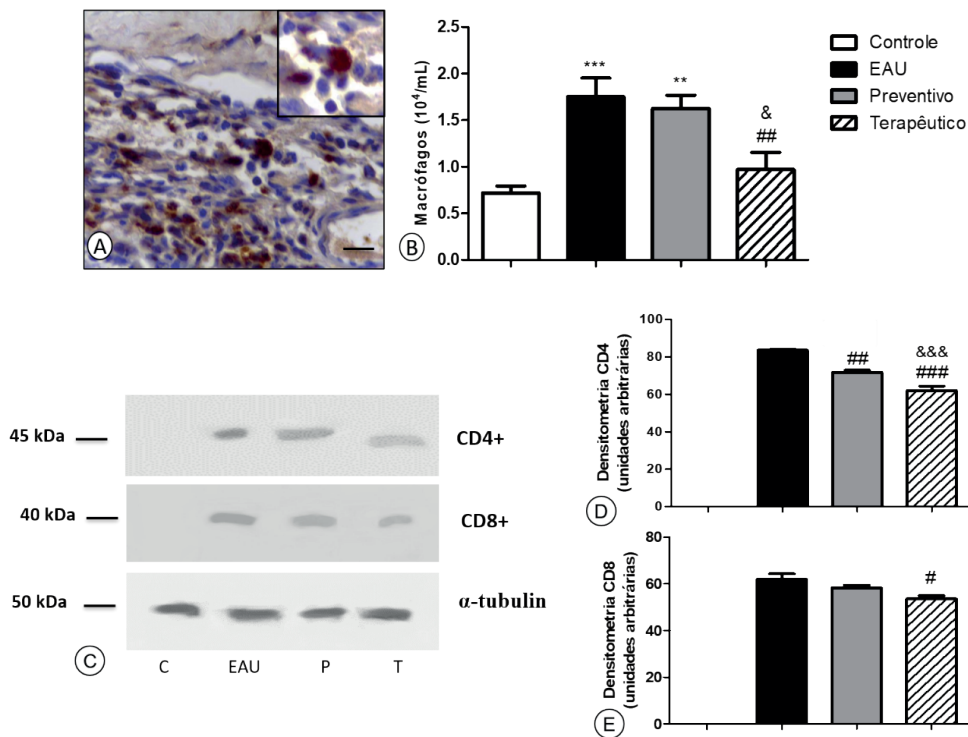
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 3. Análise histopatológica. Segmentos anterior (processo ciliar) e posterior (retina) dos olhos dos animais controle com ausência de células inflamatórias (A e E) e influxo de leucócitos (setas) nestas regiões 14 dias após a indução da EAU (B e F). Células inflamatórias diminuídas por tratamentos com peptídeo Ac2-26 (C, D, G e H). Quantificação de leucócitos no humor aquoso (I, J e K). Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.E.M, *** $p < 0,001$ vs Controle; ### $p < 0,001$ vs EAU; &&& $p < 0,001$ vs Tratamento preventivo.



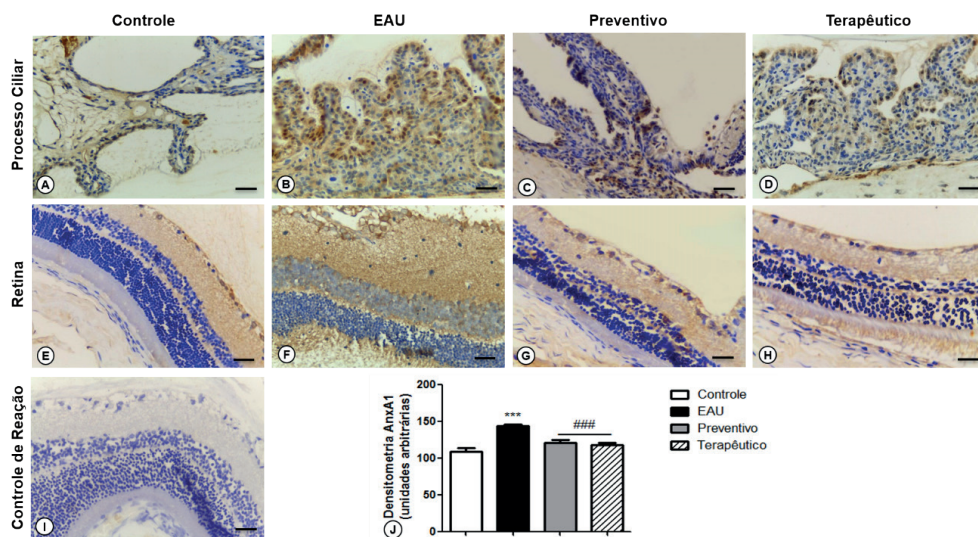
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 4. Análise de quantificação de macrófagos oculares. Poucos macrófagos (A e B) no grupo controle. Aumento dessas células no grupo EAU e redução após tratamentos com o peptídeo Ac2-26, principalmente na administração terapêutica (B) (n=10/grupo). Contracoloração: Hematoxilina. Barras 10 μ m. Linfócitos CD4+ e CD8+ em sobrenadantes oculares. Western blot representativo ilustrando CD4+ e CD8+. α -tubulina foi usada como controle (C). Análise densitométrica de CD4+ (D) e CD8+ (E). *** p<0,001 e **p<0,01 vs controle; ### p<0,01, ## p<0,01 e #p<0,5 vs EAU; e &&& p<0,001 e &p<0,05 vs Tratamento Preventivo.



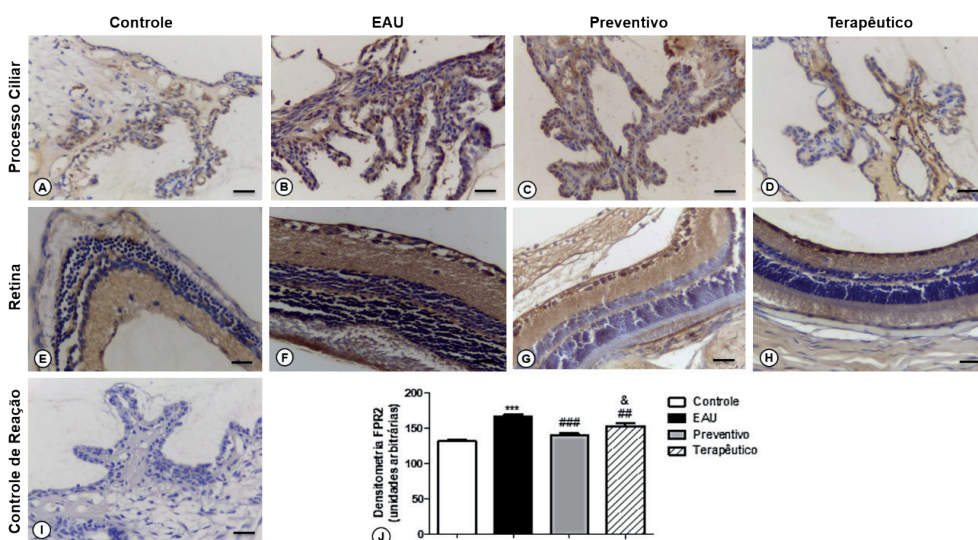
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 5. Expressão endógena de AnxA1 em tecidos oculares em EAU. Expressão de AnxA1 em processos ciliares (A) e retina (E) em animais controle. Imunorreatividade aumentada de ANXA1 em EAU não tratada (B, F e J) e imunocoloração diminuída após tratamentos preventivos (C, G e J) e terapêuticos (D, H e J). Ausência de imunorreatividade no controle da reação (I). Seções: 4 μ m. Contracoloração: Hematoxilina. Barra: 10 μ m. *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs Tratamento Preventivo e Tratamento Terapêutico.



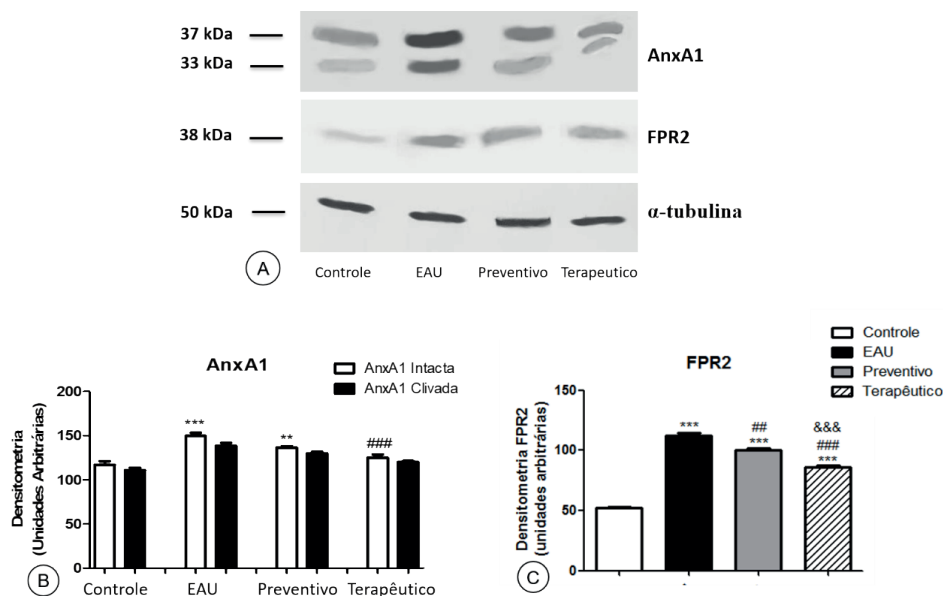
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 6. Expressão do receptor fpr2 em tecidos oculares em EAU. Aumento da imunorreatividade do fpr2 não tratado-EAU no processo ciliar (B e J) e retina (F e J) em relação ao grupo controle (A e E). Redução da imunocoloração após tratamentos preventivos (C, G e J) e terapêuticos (D, H e J). Ausência de imunorreatividade no controle da reação (I). Seções: 4 μ m. Contracoloração: Hematoxilina. Barra: 10 μ m. *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ e ## $p < 0,01$ vs EAU; & $p < 0,05$ vs Tratamento Preventivo.



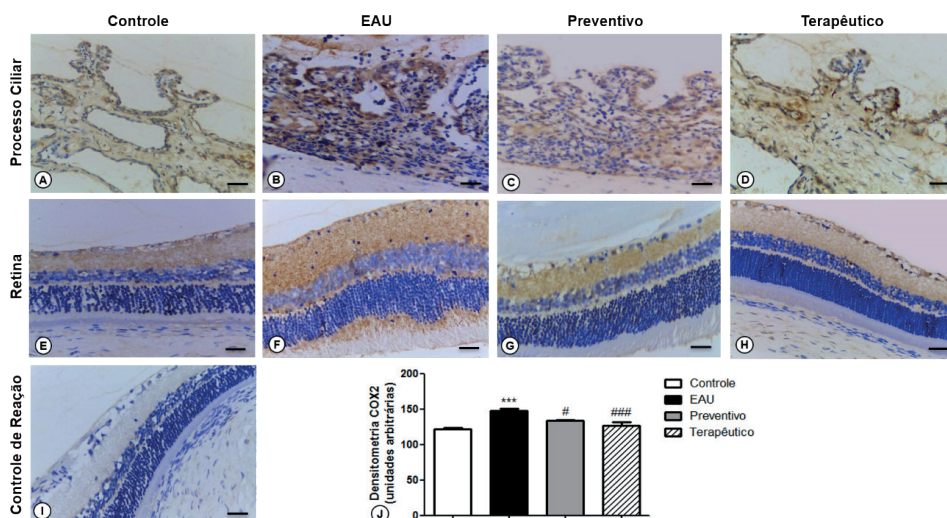
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 7. Expressões de AnxA1 e fpr2 em sobrenadantes de olho macerado. Western blot representativo ilustrando formas intactas (37 kDa) e clivadas (33 kDa) de AnxA1 e fpr2. α -tubulina foi usada como controle. (A) As bandas são representativas de pelo menos três experimentos com resultados semelhantes. Análise densitométrica de AnxA1 (B) e fpr2 (C). *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs controle; # $p < 0,05$ vs EAU.



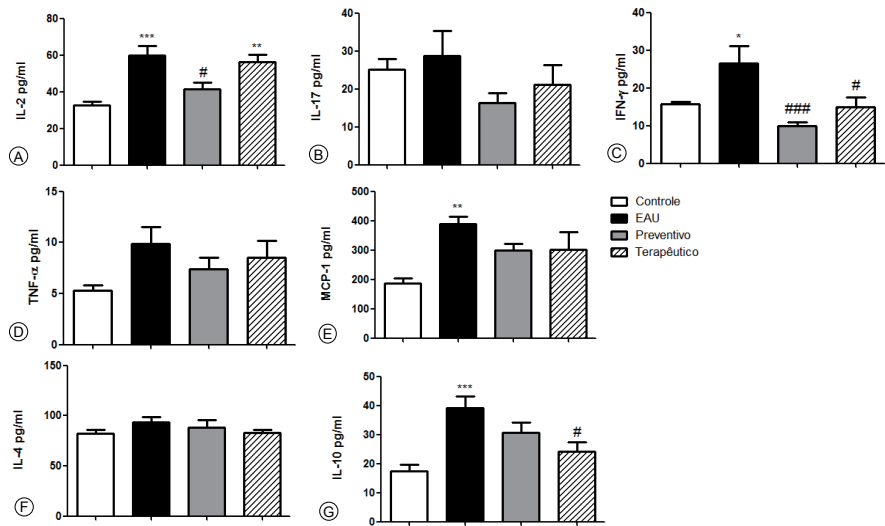
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 8. Expressão de COX-2 em tecidos oculares em EAU. Expressão reduzida de COX-2 em processos ciliares (A) e retina (E) em animais controle. Aumento da imunoreatividade da COX-2 em EAU (B, F e J) e diminuição da imunocoloração após tratamentos preventivos (C, G e J) e terapêuticos (D, H e J). Ausência de imunoreatividade no controle da reação (I). Seções: 4 μ m. Contracoloração: Hematoxilina. Barra: 10 μ m. Ausência de imunoreatividade no controle da reação (I). *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ e # $p < 0,05$ vs EAU.



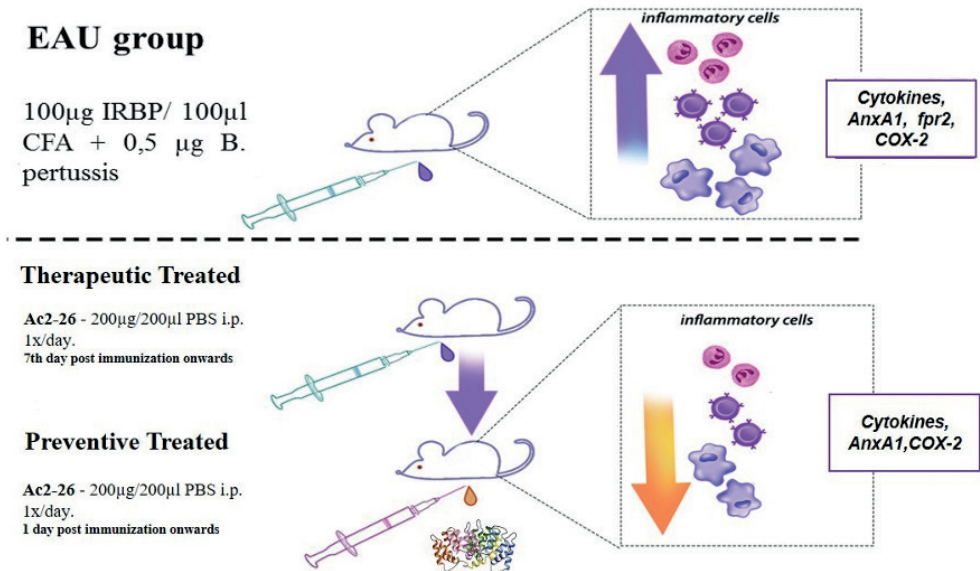
Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 9. Medição de citocinas no macerado ocular. Pró-inflamatório: IL-2 (A); IL-17 (B); IFN- γ (C); TNF- α (D); MCP-1 (E), Anti-inflamatório: IL-4 (F) e IL-10 (G). Resultados apresentados como média $\pm$ S.E.M. (n=10/grupo). *** p<0,001; ** p<0,01 e * p<0,05 vs controle; ### p<0,001 e # p<0,05 vs EAU.



Fonte: Elaborado pela autora

Fig. 10. Graphical Abstract



Fonte: Elaborado pela autora

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, no modelo de uveíte autoimune experimental, permitem concluir que a administração do peptídeo mimético Ac2-26 da AnxA1:

1. Mantém a vascularização, tamanho de pupila e transparência na câmara anterior semelhantes aos controles.
2. Promove a resolução do processo inflamatório pela redução de linfócitos no HA em ambos os tratamentos e também de neutrófilos e macrófagos no HA, bem como dos macrófagos nos segmentos oculares pelo tratamento terapêutico.
3. Reduz a expressão endógena de AnxA1 e COX-2, mas mantém níveis elevados de fpr2, especialmente no grupo de tratamento terapêutico.
4. Diminui a expressão de CD4+ em ambos os grupos tratados e de CD8+ no grupo tratado terapeuticamente.
5. Reduz, no sobrenadante do macerado ocular, a liberação dos mediadores pró-inflamatórios IL-2 no grupo preventivo, IFN- γ em ambos os grupos e da citocina anti-inflamatória IL-10 no grupo terapêutico.
6. Entre os tratamentos, o terapêutico foi o mais eficaz na modulação do processo inflamatório.

Em conjunto, nossos resultados enfatizam o envolvimento da AnxA1 e seu peptídeo mimético Ac2-26, na resolução da inflamação ocular autoimune, e demonstram a potencial aplicação do Ac2-26 em condições inflamatórias oculares, especialmente no tratamento terapêutico.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, R. et al. Current approach in diagnosis and management of anterior uveitis. **Indian J Ophthalmol**. Jan-Feb 2010;58(1):11-9.
- ALLCOCK, G. et al. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. **Clin Exp Immunol**, 2001 Jan;123(1):62-7.
- BABU, B. M.; RATHINAM, S. R. Intermediate uveitis. **Indian J Ophthalmol**, Jan-Feb 2010;58(1):21-7.
- BANSAL, R.; GUPTA, V.; GUPTA, A. Current approach in the diagnosis and management of panuveitis. **Indian J Ophthalmol**, Jan-Feb 2010;58(1):45-54.
- BHUYAN, Z. A. et al. Abrogation of Rbpj Attenuates Experimental Autoimmune Uveoretinitis by Inhibiting IL-22-Producing CD4(+) T Cells. **PLoS One**, 2014 Feb 28;9(2):e89266.
- BRUSCHI, M. et al. Annexin A1 and Autoimmunity: From Basic Science to Clinical Applications. **Int J Mol Sci**. 2018 May 3;19(5):1348
- CARDIN, L. T. et al. ANXA1 Ac2-26 peptide, a possible therapeutic approach in inflammatory ocular diseases. **Gene**, 2017 May 30;614:26-36.
- CEHOFSKI, L.J. et al. IL-18 and S100A12 Are Upregulated in Experimental Central Retinal Vein Occlusion. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018 Oct 25;19(11):3328.
- CHOI, R.Y; RIVERA-GRANA, E; ROSENBAUM, J.T. Reclassifying Idiopathic Uveitis: Lessons From a Tertiary Uveitis Center, **Am J Ophthalmol**, 2019 Feb;198:193-199.
- CIRINO, G. et al. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. **Br J Pharmacol**, 1993 Mar;108(3):573-4.
- D'ACQUISTO, F. On the adaptive nature of annexin-A1. **Curr Opin Pharmacol**, 2009 Aug;9(4):521-8.
- D'ACQUISTO, F. et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, 2007 Feb 1;109(3):1095-102.
- D'ACQUISTO, F. et al. Glucocorticoid treatment inhibits annexin-1 expression in rheumatoid arthritis CD4+ T cells. **Rheumatology (Oxford)**, 2008 May;47(5):636-9.
- D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **Br J Pharmacol**, 2008 Sep;155(2):152-69.
- DA SILVA, P. S.; GIROL, A. P.; OLIANI, S. M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. **Molecular Vision**, 2011;17:1310-9.
- DA SILVA, R.A. et al. Evaluation of Annexin A1 Protein in an Infectious Keratitis Model: Therapeutic Perspectives. **Current Trends in Ophthalmology**, 2019;2(1):104-112.
- DAMAZO, A. et al. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. **J Immunol**, 2006 Apr 1;176(7):4410-8.

- DUICA, I. et al. The use of biologic therapies in uveitis. **Rom J Ophthalmol**. Apr-Jun 2018;62(2):105-113.
- EGWUAGU, C. E.; LARKIN III, J. Therapeutic targeting of STAT pathways in CNS autoimmune diseases. **JAKSTAT**, 2013 Jan 1;2(1):e24134.
- FANG, C. B. et al. Amelioration of experimental autoimmune uveitis by leflunomide in Lewis rats. **PLoS One**, 2013 Apr 23;8(4):e62071.
- FORRESTER, J.V; KUFFOVA, L; DICK, A.D. Autoimmunity, Autoinflammation, and Infection in Uveitis. **Am J Ophthalmol**, 2018 May;189:77-85.
- GAMALERO, L. et al. Evidence-Based Treatment for Uveitis. **Isr Med Assoc J**, 2019 Jul;21(7):475-479.
- GARDNER, P.J. et al. Augmenting Endogenous Levels of Retinal Annexin A1 Suppresses Uveitis in Mice. **Transl Vis Sci Technol**, 2017 Oct 5;6(5):10.
- GASPARIN, F. et al. Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. **Arq Bras Oftalmol**, Mar-Apr 2012;75(2):143-7.
- GASTARDELO, T. et al. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. **Am J Pathol**, 2009 Jan;174(1):177-83.
- GASTARDELO, T. S. et al. Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. **PLoS One**. 2014 Dec 9;9(12):e111317.
- GAVINS, F. et al. A twist in anti-inflammation: annexin 1 acts via the lipoxin A4 receptor. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, Sep-Oct 2005;73(3-4):211-9.
- GERY, I. et al. Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 1986 Aug;27(8):1296-300.
- GIMENES, A. D et. al. Beneficial effect of annexin A1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. **Exp Eye Res**. 2015 May;134:24-32.
- GIROL, A. P. 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 Jun 1;190(11):5689-701.
- GIROL, A.P. et al. Annexin A1 Mimetic Peptide and Piperlongumine: Anti-Inflammatory Profiles in Endotoxin-Induced Uveitis. **Cells**, 2021 Nov 15;10(11):3170.
- GOBBETTI, T.; COORAY, S. N. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. **Biol Chem**. 2016 Oct 1;397(10):981-93.
- GUEDES, M. C. E; BORREGO, L. M; PROENÇA, R. D. Roles of interleukin17 in uveitis. **Indian Journal of Ophthalmology**. 2016 Sep;64(9):628-634.
- HAN, P. F. et al. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. **Chin J Traumatol**. 2020 Apr;23(2):96-101.

- HEILIGENHAUS, A. et al. Anti-inflammatory treatment of uveitis with biologicals: new treatment options that reflect pathogenetic knowledge of the disease. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 2010 Nov;248(11):1531-51.
- HUANG, P. et al. Interaction between ANXA1 and GATA-3 in immunosuppression of CD4⁺ T cells. **Mediat Inflamm**, 2016;2016:1701059.
- HUEBNER, K. et al. Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II. **Oncogene Res**, 1988 May;2(4):299-310.
- JANCEVSKI, M.; FOSTER, C. Cataracts and uveitis. **Discov Med**, 2010 Jan;9(44):51-4.
- KAMAL, A.; FLOWER, R.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2005 Mar;100 Suppl 1:39-47.
- LEE, F.; FOSTER, C. Pharmacotherapy of uveitis. **Expert Opin Pharmacother**, 2010 May;11(7):1135-46.
- LI, X. et al. Matairesinol ameliorates experimental autoimmune uveitis by suppression of IRBP-specific Th17 cells. **J Neuroimmunol**. 2020 Aug 15;345:577286.
- LIM, L.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J**, 2007 Apr;21(4):968-75.
- LIZARBE, M. A. et al. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. **Int J Mol Sci**, 2013 Jan 28;14(2):2652-83.
- MARMORATO, M.P. et al. Involvement of the annexin A1-Fpr anti-inflammatory system in the ocular allergy. **European Journal of Pharmacology**, 2019 Jan 5;842:298-305.
- MIMURA, K. K. et al. The involvement of anti-inflammatory protein, annexin A1, in ocular toxoplasmosis. **Mol Vis**, 2012;18:1583-93.
- MUNN, T.; MUES, G. Human lipocortin similar to ras gene products. **Nature**, 1986 Jul 24-30;322(6077):314-5.
- OLIANI, S. et al. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. **Lab Invest**, 2000 Sep;80(9):1429-38.
- OLIANI, S.; DAMAZO, A.; PERRETTI, M. Annexin 1 localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators Inflamm**, 2002 Oct;11(5):287-92.
- OLIANI, S. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol**, 2001 Feb;158(2):603-15.
- OLIANI, S.; PERRETTI, M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. **Ital J Anat Embryol**, 2001;106(2 Suppl 1):69-77.
- OOI, K. et al. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? **Clin Med Res**, 2006 Dec;4(4):294-309.
- PASADHIKA, S.; ROSENBAUM, J. T. Update on the use of systemic biologic agents in the treatment of noninfectious uveitis. **Biologics**, 2014 Feb 15;8:67-81.

PAPOTTO, P.H. et al. Novel CD28 antagonist mPEG PV1-Fab' mitigates experimental autoimmune uveitis by suppressing CD4+ T lymphocyte activation and IFN- γ production. **PLoS One**, 2017 Mar 1;12(3):e0171822.

PATEL, H. B. et al. The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis. **Ann Rheum Dis**, 2012 Nov;71(11):1872-80.

PEPINSKY, R. et al. Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. **J Biol Chem**, 1988 Aug 5;263(22):10799-811.

PERRETTI, M. et al. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell Biol Int**, 2000;24(3):163-74.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, 2009 Jan;9(1):62-70.

PERRETTI, M.; DALLI, J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. **Br J Pharmacol**, 2009 Oct;158(4):936-46.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **J Leukoc Biol**, 2004 Jul;76(1):25-9.

PERRETTI, M.; GAVINS, F. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. **News Physiol Sci**, 2003 Apr;18:60-4.

PERRETTI, M. et al. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. **Am J Pathol**, 2001 Jun;158(6):1969-73.

POSSEBON, L.; COSTA, S.S.; SOUZA, H.R.; et al. Mimetic peptide AC2-26 of annexin A1 as a potential therapeutic agent to treat COPD. **Int Immunopharmacol**, 2018a; 63:270-28.

RAYNAL, P.; POLLARD, H. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1994 Apr 5;1197(1):63-93.

READ, R. Uveitis: advances in understanding of pathogenesis and treatment. **Curr Rheumatol Rep**, 2006 Aug;8(4):260-6.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **J Cell Sci**, 2004 Jun 1;117(Pt 13):2631-9.

RODRIGUES-LISONI, F. C. et al. In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. **FEBS Lett**, 2006 Feb 20;580(5):1431-8.

RONG, H. et al. Notch signaling suppresses regulatory T cell function in murine experimental autoimmune uveitis. **Immunology**, 2016 Dec;149(4):447-459.

ROVIEZZO, F. et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. **J Physiol Pharmacol**, 2002 Dec;53(4 Pt 1):541-53.

SCHLOER, S.; PAJONCZYK, D.; RESCHER, U. Annexins in Translational Research: Hidden Treasures to Be Found. **Int J Mol Sci**, 2018 Jun 15;19(6):1781.

SENA, A. et al. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clin Exp Allergy**, 2006 Oct;36(10):1260-7.

SHAO, G. et al. Advancements of Annexin A1 in inflammation and tumorigenesis. **Onco Targets Ther**. 2019 Apr 30;12:3245-3254.

SHEIKH, M.H.; SOLITO, E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. **Int J Mol Sci**, 2018 Mar 31;19(4):1045.

SINNIAH, A. et al. Endogenous Annexin-A1 Negatively Regulates Mast Cell-Mediated Allergic Reactions. **Frontiers in Pharmacology**, 2019 Nov 13;10:1313.

SOLITO, E. et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB J**, 2006 Jul;20(9):1498-500.

SOLITO, E. et al. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. **Br J Pharmacol**, 2001 May;133(2):217-28.

SOLITO, E. et al. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. **FASEB J**, 2003 Aug;17(11):1544-6.

SUN, J. et al. Annexin 1 protects against apoptosis induced by serum deprivation in transformed rat retinal ganglion cells. **Molecular Biology Reports**, 2012 May;39(5):5543-51.

SUGIMOTO M.A, VAGO J.P, TEIXEIRA M.M, SOUSA L.P. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. **Journal of Immunology Research**, 2016;2016:8239258.

SRIVASTAVA, A.; RAJAPPA, M.; KAUR, J. Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. **Clin Chim Acta**, 2010 Sep 6;411(17-18):1165-71.

SCHWARTZMAN S. Advancements in the management of uveitis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**. 2016 Apr;30(2):304-315.

TADEI, M. B. et al. Expression of the Annexin A1 and its correlation with matrix metalloproteinases and the receptor for formylated peptide-2 in diffuse astrocytic tumors. **Ann Diagn Pathol**. 2018 Dec;37:62-66.

TAKAOKA, R.T.C. et al. Expression profiles of Annexin A1, formylated peptide receptors and cyclooxygenase-2 in gastroesophageal inflammations and neoplasias. **Pathol Res Pract**. 2018 Feb;214(2):181-186.

TANG K. et al. Immunomodulatory effects of Longdan Xiegan Tang on CD4+/CD8+ T cells and associated inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune uveitis. **Mol Med Rep**. 2016 Sep;14(3):2746-54.

TSIROUKI, T. et al. A Focus on the Epidemiology of Uveitis. **Ocul Immunol Inflamm**, 2018;26(1):2-16.

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 May;5(5):831-40.

YADAV, U. C. et al. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by aldose reductase inhibition in Lewis rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2011 Oct 11;52(11):8033-41.

YANG, H. et al. Modulating of ocular inflammation with macrophage migration inhibitory factor is associated with notch signalling in experimental autoimmune uveitis. **Clin Exp Immunol**, 2016 Feb;183(2):280-93.

YAZID, S. et al. Annexin-A1 restricts Th17 cells and attenuates the severity of autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, 2015 Apr;58:1-11.

YE, R. D. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol Rev**, 2009 Jun;61(2):119-61.

ZHONG, Z. et al. Activation of the interleukin-23/interleukin-17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis. **Prog Retin Eye Res**. 2020 May 16;100866.

Proteína anti-inflamatória **Anexina A1** como alternativa terapêutica na uveíte autoimune experimental

 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)

 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Proteína anti-inflamatória **Anexina A1** como alternativa terapêutica na uveíte autoimune experimental

 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)

 www.facebook.com/atenaeditora.com.br