

## **EFEITO DA PROTEÍNA ANEXINA 1 COMO UM RECURSO TERAPÊUTICO NO TRANSPLANTE DE PELE.**

Fernanda Vargas e Silva Castanheira, Sonia Maria Oliani, Rodrigo Antonio Parra Teixeira e Amílcar Sabino Damazo. – Morfologia– Ciências Biológicas – Depto de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto.

A mais de uma década, vários estudos têm descrito o papel da proteína anexina-A1 (AnxA1) na função leucocitária, na fisiofarmacologia dos mediadores inflamatórios e no processo de ativação e recrutamento dos neutrófilos (PERRETTI & D'AQUISTO, 2006). A AnxA1 foi identificada originalmente como responsável por vários efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides, como a inibição dos eicosanóides (FLOWER & BLACKWELL, 1979) e a regulação da adesão dos neutrófilos (PERRETTI, 1997). Vários trabalhos têm caracterizado a região N-terminal da AnxA1 como promotora da ação antiinflamatória, sendo que os resultados experimentais com peptideomiméticos (seqüências curtas de 1,5 a 3,5 kDa da região N-terminal), tais como o peptídeo Ac2-26, confirmam a presença desse sítio ativo antiinflamatório (OLIANI et al, 2001, GAVINS et al., 2003). Alguns trabalhos sugerem que a AnxA1 atua como uma proteína de estresse celular, apresentando similaridades às proteínas de choque térmico (Hsp), como por exemplo, na regulação da morte celular em tímócitos de ratos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GIDROL et al., 1996) e na redução do dano cardíaco induzido por leucócitos associado com a lesão por isquemia/reperfusão (GAVINS et al., 2005).

A AnxA1 também regula os efeitos pró-apoptóticos dos glicocorticóides em vários leucócitos e células epiteliais, através da ativação da caspase 3 e/ou influxo de cálcio intracelular (SOLITO et al., 2001). Além disso, a ANXA1 exógena estimula o aumento de cálcio intracelular seguido pela desfosforilação da proteína pró-apoptótica Bad, induzindo apoptose em neutrófilos, detectada pelo aumento da expressão da proteína anexina 5 (SOLITO et al., 2003). A apoptose de leucócitos, principalmente linfócitos, podem proteger tecidos lesados contra a morte necrótica induzida pela interação de antígenos e receptores de células T, inibindo a liberação de mediadores citotóxicos e enzimas proteolíticas (PERRETTI & SOLITO, 2004).

Diante da ação protetora da AnxA1, investigamos a ação do peptídeo da AnxA1 como um recurso terapêutico na inibição da resposta inflamatória da rejeição do aloenxerto de pele, entre duas linhagens de camundongos completamente incompatíveis quanto ao complexo de histocompatibilidade (MHC): C57BL/6 (receptores) e Balb/c (doadores).

Os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal (i.p.) de Dopalen (60%) e Anasedan (40%) dissolvidos em PBS estéril. Para obtenção do enxerto, uma incisão sagital (1 cm da base da cauda) foi feita na pele dos animais BALB/c. Em seguida, outra incisão transversal foi realizada em torno da cauda, sendo a pele removida e colocada em solução fisiológica, onde permaneceu até o momento do uso. A implantação do aloenxerto foi iniciada com a tricotomia, seguida da retirada de 1 cm<sup>2</sup> de pele no dorso dos animais receptores C57BL/6. Após, o segmento de pele da cauda do animal doador, BALB/c, foi implantada e fixada por sutura com fio 0,8.

Os animais do grupo tratado receberam 100 µg i.p. do peptídeo Ac2-26, derivado da região N-terminal da proteína AnxA1, por 4 dias consecutivos. A droga foi administrada no dia -1 (um dia antes do procedimento cirúrgico), no dia 0 (dia do transplante) e nos dias +1 e +2. No 5º dia pós-transplante, os camundongos foram novamente anestesiados para coleta de amostras de sangue (1 ml por animal) para quantificação dos leucócitos na câmara de Neubauer. Em seguida, após o sacrifício, os leucócitos isolados do sangue e fragmentos de pele foram fixados (paraformaldeído a 4% e em glutaraldeído a 0,5%) por 2 horas, a 4°C. Após, foram desidratados em série crescente de etanol e incluídos na resina LRGold (London Resin Co., Reading, Berkshire, UK) para análise morfológica. Finalmente, para quantificação de células em apoptose, secções de pele foram incubadas com o anticorpo primário *rabbit* policlonal contra a anexina 5 (AnxA5) humana (Santa Cruz, Santa Cruz, Califórnia, USA), seguido do anticorpo secundário *goat anti-rabbit IgG* (Fc fragmento específico) conjugado com ouro coloidal de 5 nm (British Biocell International, Cardiff, UK) e contra coradas com hematoxilina/eosina. Para quantificação da expressão da

proteína endógena AnxA1, utilizou-se o anticorpo primário *rabbit* policlonal anti-AnxA1 (Zymed Laboratories, Cambridge, UK), seguido do secundário fluorescente FITC *anti-rabbit IgG* (Serotec, Oxford, UK). A reação de imunofluorescência foi analisada densitometricamente com o *software* Axiovision acoplado no microscópio AXIOSKOP 2 (ZEISS).

O grupo de animais C57BL/6 submetido ao transplante de pele apresentou 100% de rejeição do aloenxerto no 10º dia após o procedimento cirúrgico, o que foi evidenciado por apresentar 90% de necrose epitelial. Entretanto, nos animais tratados com o peptídeo Ac2-26, a rejeição do aloenxerto foi retardada, ocorrendo apenas no 15º dia, demonstrando a eficiência deste peptídeo em prolongar a sobrevivência do aloenxerto de pele. Para melhor compreender os mecanismos de retardo da rejeição tecidual, realizamos análises da cinética celular, morfologia e imuno-histoquímica após 5 dias do transplante. A análise estatística dos leucócitos circulantes no sangue periférico demonstrou que houve uma redução significativa na quantidade de neutrófilos ( $0,9 \pm 0,1 \times 10^6$  e  $0,6 \pm 0,1 \times 10^6$  células/ml, respectivamente nos grupos sem tratamento e tratado) e de linfócitos ( $2,2 \pm 0,1 \times 10^6$  e  $1,4 \pm 0,1 \times 10^6$  células/ml).

A análise histológica do aloenxerto dos animais sem tratamento, 5 dias após o transplante, mostrou a presença de um infiltrado de células inflamatórias na região da derme profunda. Entre estas células, destacamos os neutrófilos transmigrados para a derme profunda ( $170,0 \pm 2,6$  células/mm<sup>2</sup>) e a presença de células inflamatórias residentes, tais como os mastócitos localizados próximos aos vasos sanguíneos e com características de desgranulação ( $4,4 \pm 0,2$  e incidência de 84%). Nos animais com tratamento, observamos um aumento do número de vasos sanguíneos, principalmente na derme, sugerindo que a AnxA1 estimulou a produção de fatores angiogênicos. Neste grupo, o tratamento induziu a redução do número de neutrófilos transmigrados ( $102,0 \pm 4,2$ ), enquanto os mastócitos apresentaram um aumento no número ( $5,2 \pm 0,1$ ) e na incidência do processo de desgranulação (100%), principalmente na região do processo de inflamação da derme profunda.

As análises imuno-histoquímicas no aloenxerto indicaram que a porcentagem de leucócitos positivos para AnxA5 foi maior no grupo tratado em relação ao não tratado (71% e 49%, respectivamente), demonstrando que um dos mecanismos de inibição da rejeição tecidual da AnxA1 atuam na indução do processo de apoptose dos leucócitos do aloenxerto. Em relação à expressão da AnxA1 endógena observamos pela imunofluorescência que os neutrófilos do grupo tratado apresentavam uma maior imunorreatividade em relação aos do grupo não tratado ( $72,1 \pm 1,5$  a.u. e  $51,4 \pm 1,5$  a.u. respectivamente). Este fato sugere que o peptídeo Ac2-26, quando administrado, pode ligar-se aos receptores (FPR) na membrana dos leucócitos desencadeando os efeitos anti-migratórios e induzindo a expressão de AnxA1 endógena, que por sua vez pode atuar autocrinamente/paracrinamente nos leucócitos.

Em conclusão, os dados obtidos nas investigações do processo pós-transplante, sugerem que o peptídeo Ac2-26 apresenta importante papel regulatório na inibição da rejeição tecidual no aloenxerto de pele, atuando com mecanismos moleculares distintos no recrutamento e na ativação das células inflamatórias, sobretudo mastócitos e neutrófilos. Assim, nós sugerimos que a proteína AnxA1 atua na biodinâmica da angiogênese e na supressão do dano tecidual induzido pelos leucócitos, indicando um possível papel imunossupressor no transplante de pele.

## Referências Bibliográficas

- FLOWER, R.J.; BLACKWELL, G.J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, v. 278, p. 456-459, 1979.
- GAVINS, F.N.; YONA, S.; KCIMAL, A.M.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Leukocyte antiadhesive action of annexin 1: ALXR – and FPR – released anti-inflammatory mechanisms blood. **Epub.**, v. 101, p. 4140-4147, 2003.
- GAVINS, F.N.E.; KAMAL, A.M.; D'AMICO, M.; OLIANI, S.M.; PERRETTI, M. (2004) Formyl-peptide receptor is not involved in the protection afforded by annexin 1 in murine acute myocardial infarct. **FASEB J**, v. 19, p. 100-102, 2005.

GIDROL, X.; SABELLI P.A.; FERN, Y.S.; KUSH, A.K. Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues delta oxyR mutant of *Escherichia coli* from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 11268-11273, 1996.

OLIANI, S.M.; PAUL-CLARK, M.J.; CHRISTIAN, H.C.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 603-615, 2001.

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 418-425, 1997.

PERRETTI, M.; SOLITO, E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. **Bioch. Soc. Transact.**, v. 32, p. 507-510, 2004.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Novel aspects of annexin 1 and glucocorticoid biology: intersection with nitric oxide and the lipoxin receptor. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 5, p. 107-114, 2006.

SOLITO, E.; DE COUPADE, C.; CANAIDER, S.; GOULDING, N.J.; PERRETTI, M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 217-228, 2001.

SOLITO, E.; KAMAL, A.; RUSSO-MARIE, F.; BUCKINGHAM, J.C.; MARULLO, S.; PERRETTI, M. A novel calcium dependent pro-apoptotic effect of annexin I on human neutrophils. **FASEB J.**, v. 17, p. 1544-56, 2003.

**Bolsa:**  
CNPq