



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José do Rio Preto

Sara de Souza Costa

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

São José do Rio Preto

2022

Sara de Souza Costa

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

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq (140789/2018-9 e 404190/2016-2)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Girol

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto

2022

C837p

Costa, Sara de Souza

Proteína anti-inflamatória Anexina A1 como alternativa terapêutica na uveíte autoimune experimental / Sara de Souza Costa. -- São José do Rio Preto, 2022

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Ana Paula Girol

Coorientadora: Sonia Maria Oliani

1. Inflamação ocular. 2. Uveíte autoimune. 3. Anexina A1. 4. Mediadores inflamatórios. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Sara de Souza Costa

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

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq (140789/2018-9 e 404190/2016-2)

Comissão Examinadora

Profa. Dra Ana Paula Girol  
UNIFIPA - Catanduva – Orientadora

Profa. Dra Rejane Maira Góes  
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra Ana Cláudia Polli Lopes  
FAMERP – São José do Rio Preto

Profa. Dra Kallyne Kioko Oliveira Mimura  
UFMT – Mato Grosso

Profa. Dra Andréia de Haro Moreno  
UNIFIPA – Catanduva

São José do Rio Preto

03 de março de 2022

## **AGRADECIMENTOS**

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 desde o tempo da graduação, sendo importante para meu desenvolvimento profissional.

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.

## 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 imunohistoquímica. Linfócitos CD4 e CD8, AnxA1 e fpr2 foram estudados por Western blotting. Interferon (IFN)- $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , 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- $\gamma$  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)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , 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- $\gamma$  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.

## LISTAS DE FIGURAS

### Introdução

<b>Figura 1.</b> Estrutura da proteína Anexina A1.....	17
--	----

### Manuscrito

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática dos grupos experimentais .....	46
<b>Figura 2.</b> Análises clínicas por biomicroscopia .....	47
<b>Figura 3.</b> Análise histopatológica.....	48
<b>Figura 4.</b> Análise de quantificação dos macrófagos, linfócitos CD4+ e CD8+ nos tecidos oculares .....	49
<b>Figura 5.</b> Expressão endógena da ANXA1 nos tecidos oculares na EAU .....	50
<b>Figura 6.</b> Expressão do receptor fpr2 nos tecidos oculares na EAU .....	51
<b>Figura 7.</b> Expressão da AnxA1 e fpr2 em sobrenadantes de macerado ocular.....	52
<b>Figura 8.</b> Expressão da COX-2 nos tecidos oculares na EAU.....	53
<b>Figura 9.</b> Dosagem de citocinas no macerado ocular.....	54
<b>Figura 10.</b> Graphical Abstract.....	55



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
mm <sup>2</sup>	Milímetros quadrados
µm	Micrômetro
µL	Micro litro
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 autoimune)	Experimental autoimmune uveitis (uveíte experimental)
ED-1	Macrófago

EIU	Uveíte induzida por endotoxina
FPRs formilados)	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos
FPR1 formilados 1)	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos
FPRL-1 formilados 2)	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos
FPR2 formilados 2)	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos
FPR2/ALX formilados 2)	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos
FPR3 formilados 2)	Formyl peptide receptor (Receptores de peptídeos
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- $\gamma$	Interferon gama
i.p	Intraperitoneal
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LXA4	Lipoxina A4
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos

mg	miligrama
MHCII classe II	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- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$ (Fator de necrose tumoral- $\alpha$ )
TGP	Glicosídeos totais de Peônia
UDPE	Unidade Didática e de Pesquisa Experimental
VKH	Vogt-Koyanagi-Harada
vs	Versus

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1. Anexina A1 e Inflamação	16
1.2. AnxA1 e Olho	18
<b>2. Objetivos</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
<b>4. MANUSCRITO</b>	<b>23</b>
1. Introdução	25
<b>2. Material e Métodos</b>	<b>27</b>
2.1 Animais	27
2.2 Modelo experimental da uveíte autoimune e protocolos de tratamento	28
2.3 Avaliação clínica da EAU	28
2.4 Análise Histopatológica	29
2.4.1 Análise quantitativa de leucócito no humor aquoso	29
2.4.2 Análise imuno-histoquímica	29
2.5 Análise de proteínas em sobrenadantes de tecido ocular após maceração	30
2.6 Análise quantitativa dos níveis de citocinas	31
2.7 Análise estatística	31
<b>3. Resultado</b>	<b>31</b>
3.1 Avaliação clínica da EAU	31
3.2 Tratamentos preventivos e terapêuticos reduzem o influxo de leucócitos na EAU	32
3.3 A administração do peptídeo Ac2-26 modula as expressões AnxA1 e fpr2	33
3.4 Os tratamentos inibem a liberação de mediadores inflamatórios	34
<b>4. Discussão</b>	<b>34</b>
<b>5. Conclusão</b>	<b>40</b>
<b>Referências</b>	<b>40</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>57</b>
<b>APÊNDICE A</b> – Artigo: Evaluation of Annexin A1 Protein in an Infectious Keratitis Model: Therapeutic Perspectives	64
<b>APÊNDICE B</b> – Artigo: Annexin A1 mimetic peptide and piperlongumine: Anti-inflammatory profiles in endotoxin-induced uveitis	65

<b>ANEXO A – Aprovação da CEUA .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO B – Comprovante de Submissão do Manuscrito .....</b>	<b>67</b>

## 1. 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 coroide), 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 (IRBP) 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<sup>+</sup>, 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)- $\alpha$ , 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).

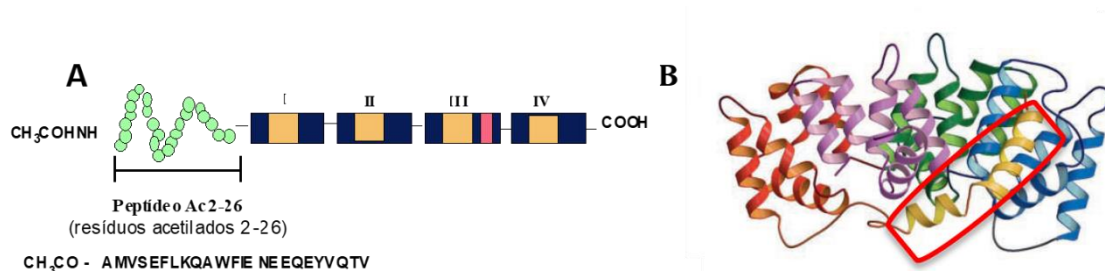
### **1.1. ANEXINA A1 E INFLAMAÇÃO**

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<sup>-/-</sup>) (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<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> sugerem que as drogas cromoglicato e nedocromil evitam a degranulação dos mastócitos por meio da liberação da proteína AnxA1. Os mastócitos de camundongos Anxa1<sup>-/-</sup> 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<sup>+</sup> autorreativas, expressão reduzida de citocinas pró-inflamatórias IL-17, IFN- $\gamma$  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.

## **2. 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<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos sobrenadantes dos macerados oculares;
- vi) Dosar nos sobrenadantes oculares após maceração, os mediadores químicos TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , interleucina IL-2, IL-17 e MCP-1 (pró-inflamatórios) e IL-4, IL-10 (anti-inflamatórios).

### **3. 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.

#### 4. MANUSCRITO

---

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

Sara de Souza Costa<sup>a,b</sup>, Lucas Possebon<sup>a,b</sup>, Jéssica Messias da Silva<sup>a</sup>, Ariane Harume Yoshikawa<sup>a</sup>, Melina Mizusaki Iyomasa Pilon<sup>a</sup>, Maria Elizabete Jimenes de Campos<sup>a</sup>, Sonia Maria Oliani<sup>b</sup>, Ana Paula Girol<sup>a,b,c</sup>

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

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

c- 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). Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, Brazil, 15.809-144

Tel.: +55-17-3311-3340/3361

e-mail: anapaula.girol@unifipa.com.br

**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 imunohistoquímica. Linfócitos CD4 e CD8, AnxA1 e fpr2 foram estudados por Western blotting. Interferon (IFN)- $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , 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- $\gamma$  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; Egwuagu 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)- $\alpha$ . 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 Anexina A1 (AnxA1) atua na limitação do processo inflamatório (Gavins et al., 2005; D'acquisti, 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'acquisti, 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 Olini, 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, Olini, 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-kB (NF-kB) 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)- $\gamma$  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 µl foram utilizados e corados em solução de Turk (90 µl). 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 µm 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 biotinilado 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 contracolorados 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<sup>2</sup>. 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 Hempstead, 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- $\alpha$  (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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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  $\pm$  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 terapeuticamente, 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 terapeuticamente, 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 terapeuticamente ( $p < 0,001$ ) (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 imunorreatividade 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- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ), 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- $\gamma$  (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- $\gamma$  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 CD44<sup>hi</sup>IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> e do perfil de CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ , bem como aumento da frequência de CD8<sup>+</sup> 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 Olini, 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 FPRL1/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- $\gamma$ , 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- $\gamma$ .

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 antagônica (Luger et al., 2014). Por exemplo, deficiência ou neutralização de INF- $\gamma$ , 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- $\gamma$ , 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- $\alpha$  (Weinstein e Pepple, 2019). Enquanto IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  aumentam a produção de quimiocinas, citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  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- $\alpha$ , INF- $\gamma$  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 células 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.

## Referência

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 interleukin-17 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., Pengm 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., Caspil, 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.

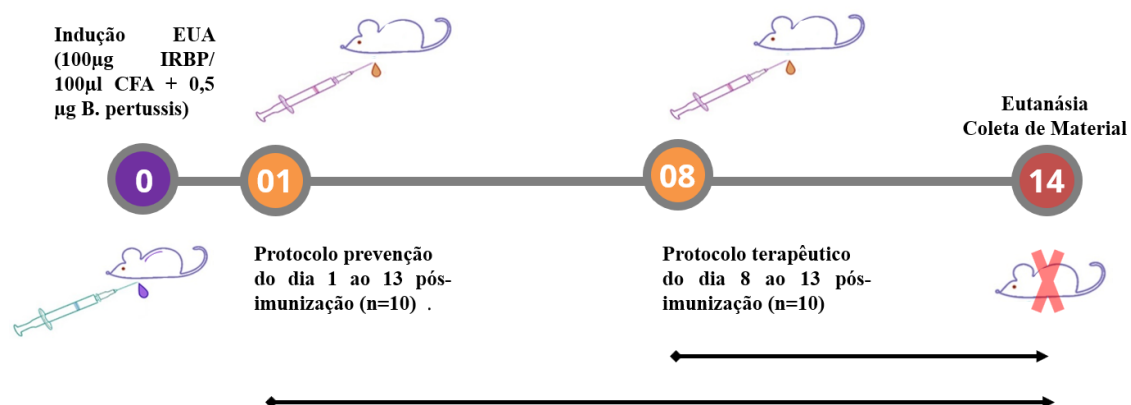
Yi, T., Zhao, D., Lin, C-L., Zhang, C., Chen, Y., Todorov, I., Lebon, T., Xu, F., Liu, T., Bi, H., Guo, D. Activation of the Notch Signaling Pathway Disturbs the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, Th17/Treg Balance in Rats With Experimental Autoimmune Uveitis. *Inflamm Res.* 2019 Sep;68(9):761-774.

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.

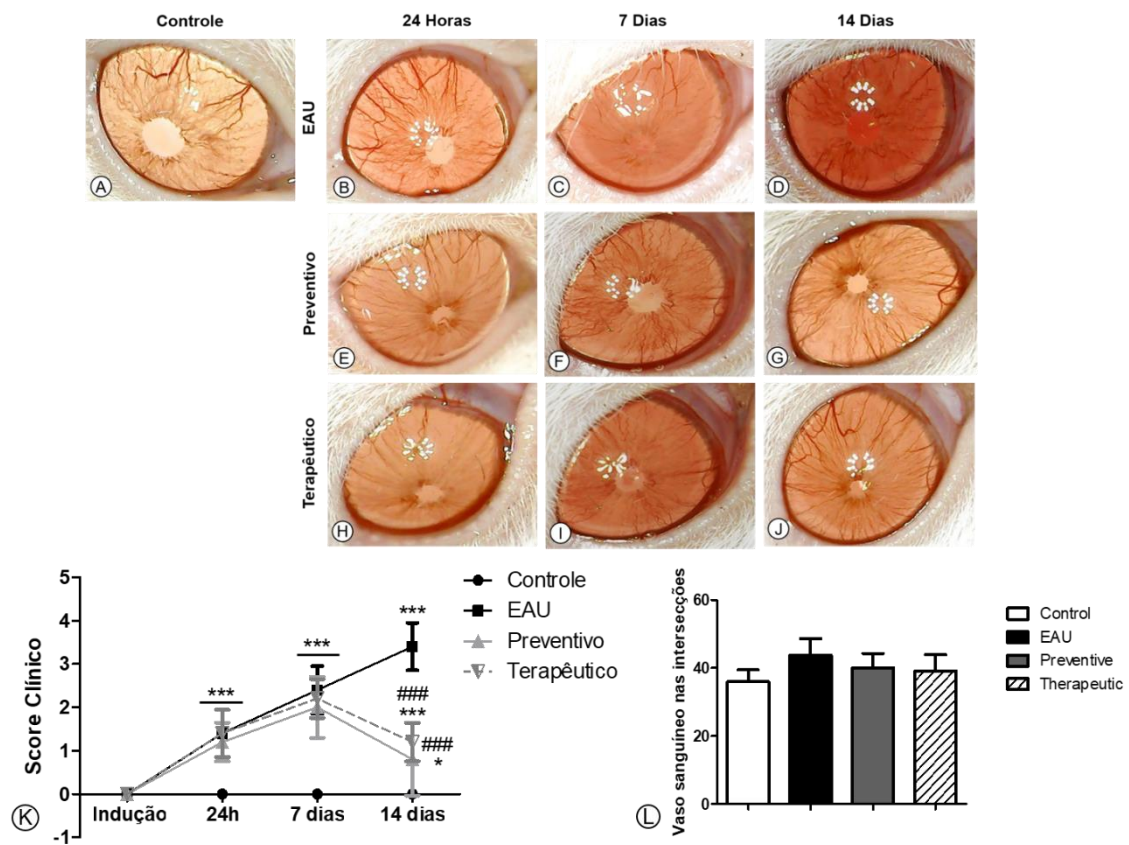
## Figuras

**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.



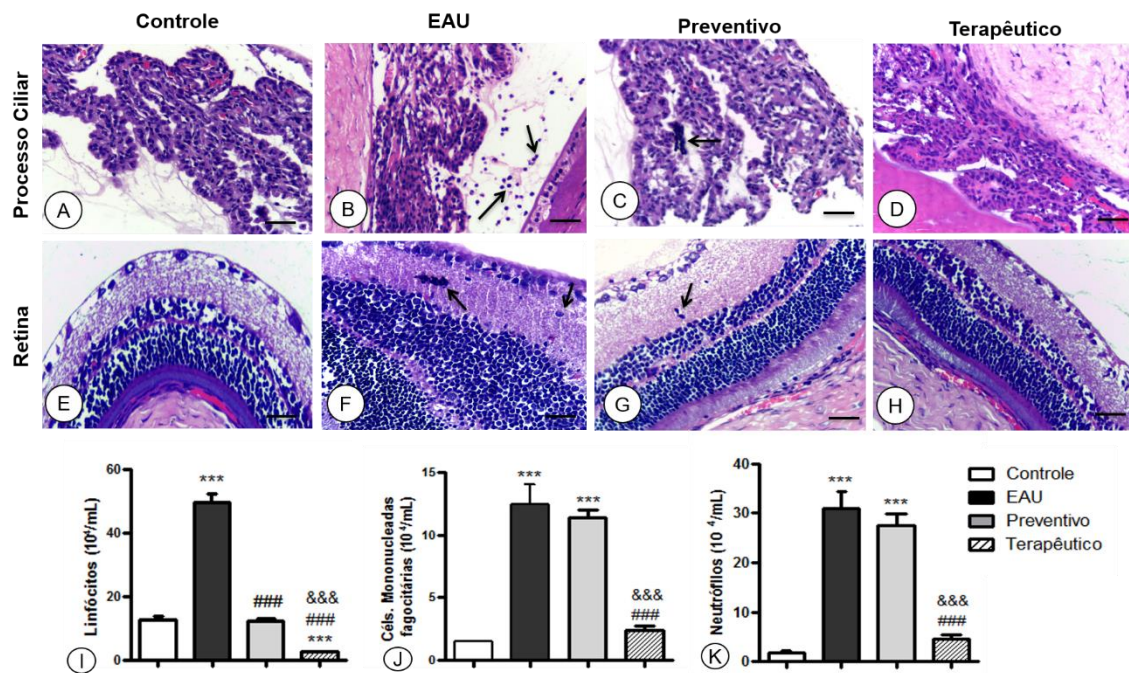
Fonte: Elaborado pela autora

**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

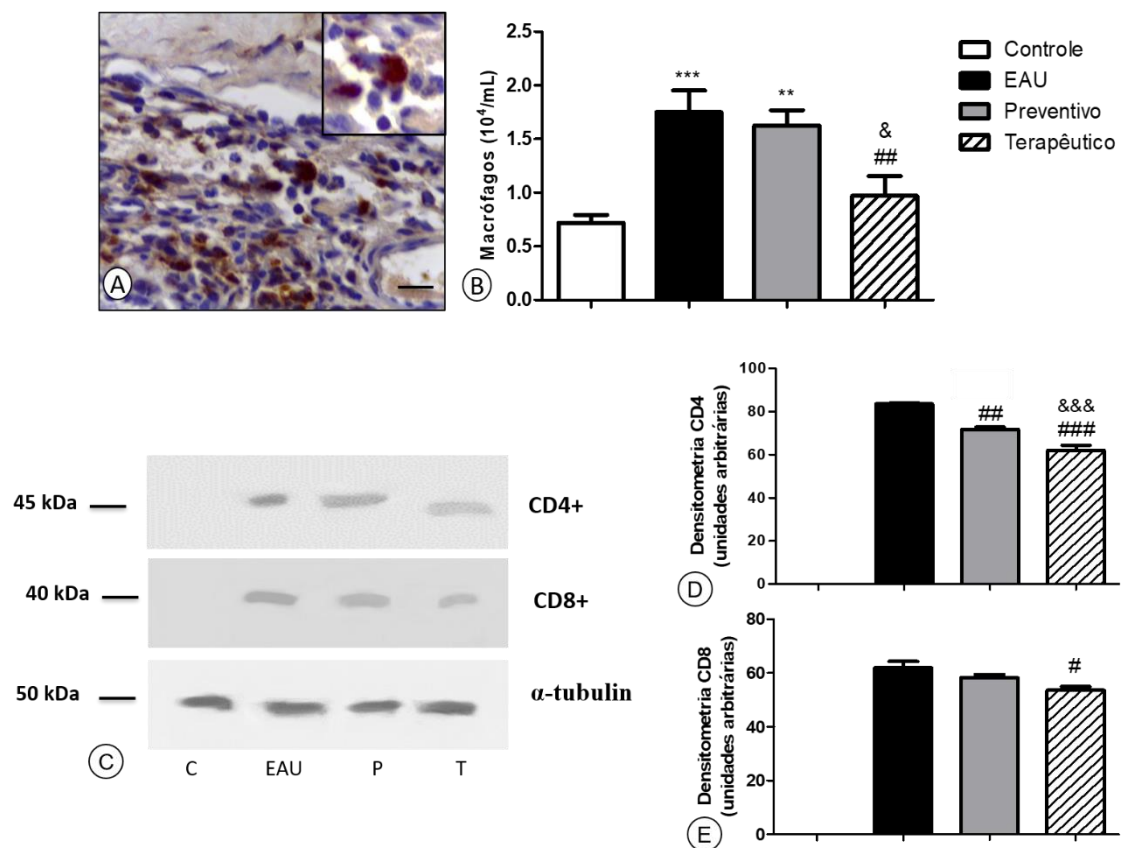
**Fig. 3. Análise histopatológica.** Segmentos anterior (processo ciliar) e posterior (retina) dos olhos dos animais controle com ausência de células inflamatórias (A e E) e influxo de leucócitos (setas) nestas regiões 14 dias após a indução da EAU (B e F). Células inflamatórias diminuídas por tratamentos 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

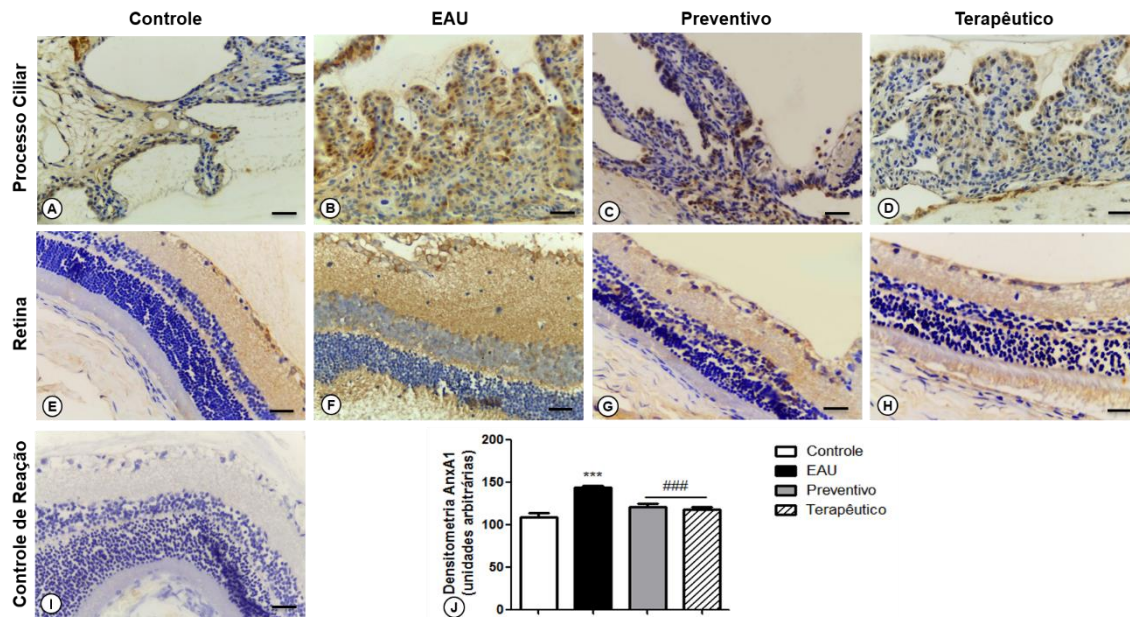


**Fig. 4. Análise de quantificação de macrófagos oculares.** Poucos macrófagos (A e B) no grupo controle. Aumento dessas células no grupo EAU e redução após tratamentos com o peptídeo Ac2-26, principalmente na administração terapêutica (B) (n=10/grupo). Contracoloração: Hematoxilina. Barras 10  $\mu$ m. Linfócitos CD4+ e CD8+ em sobrenadantes oculares. Western blot representativo ilustrando CD4+ e CD8+.  $\alpha$ -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.



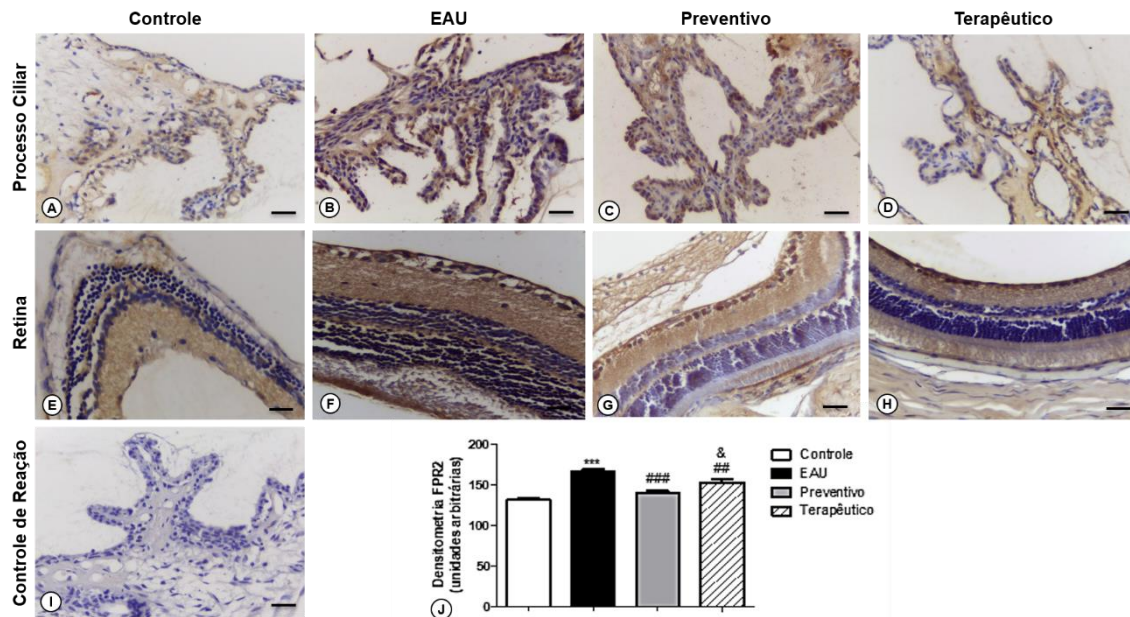
Fonte: Elaborado pela autora

**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 µm. Contracoloração: Hematoxilina. Barra: 10 µm. \*\*\*  $p < 0,001$  vs controle; ###  $p < 0,001$  vs Tratamento Preventivo e Tratamento Terapêutico.



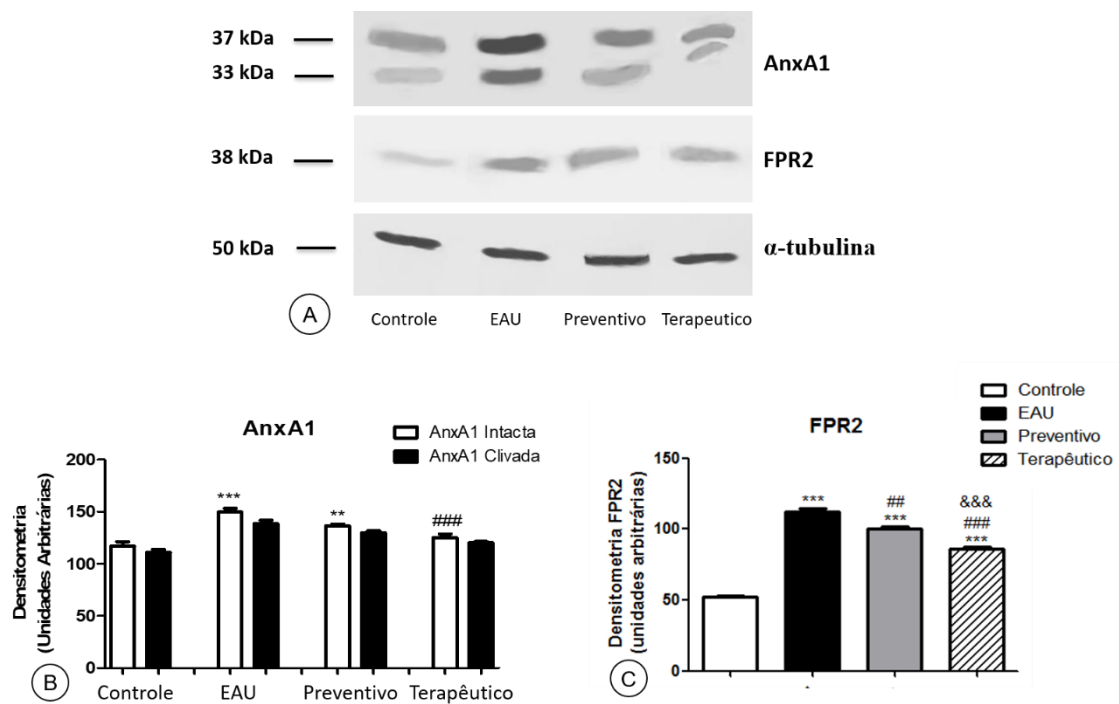
Fonte: Elaborado pela autora

**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 µm. Contracoloração: Hematoxilina. Barra: 10 µm. \*\*\*  $p < 0,001$  vs controle; ###  $p < 0,001$  e ##  $p < 0,01$  vs EAU; &  $p < 0,05$  vs Tratamento Preventivo.



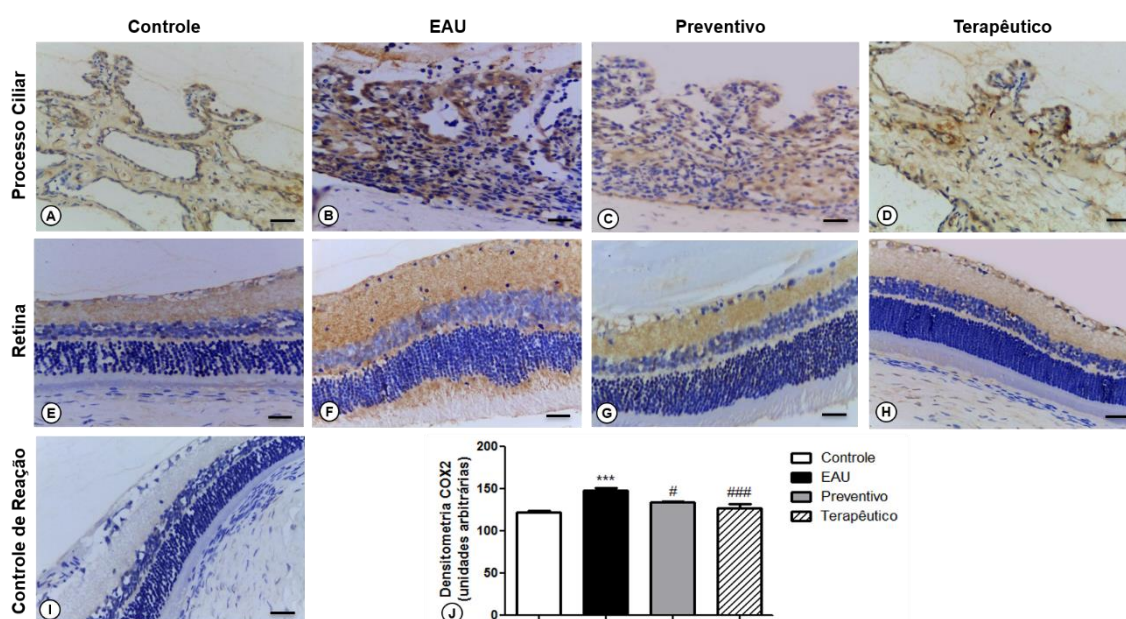
Fonte: Elaborado pela autora

**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.  $\alpha$ -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.



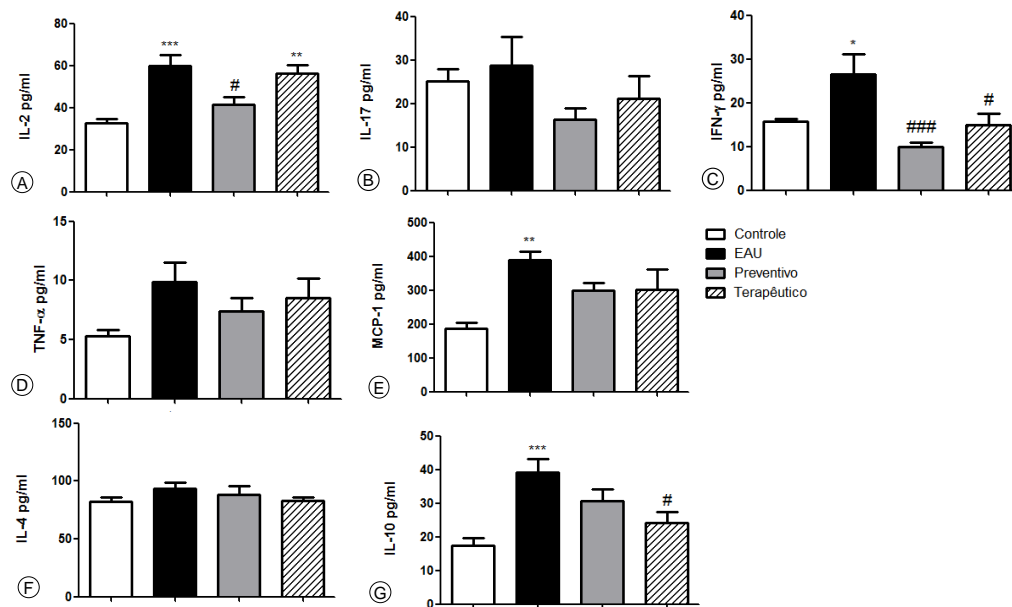
Fonte: Elaborado pela autora

**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 imunorreatividade 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 imunorreatividade no controle da reação (I). Seções: 4 µm. Contracoloração: Hematoxilina. Barra: 10 µm. Ausência de imunorreatividade no controle da reação (I). \*\*\*  $p < 0,001$  vs controle; ###  $p < 0,001$  e #  $p < 0,05$  vs EAU.



Fonte: Elaborado pela autora

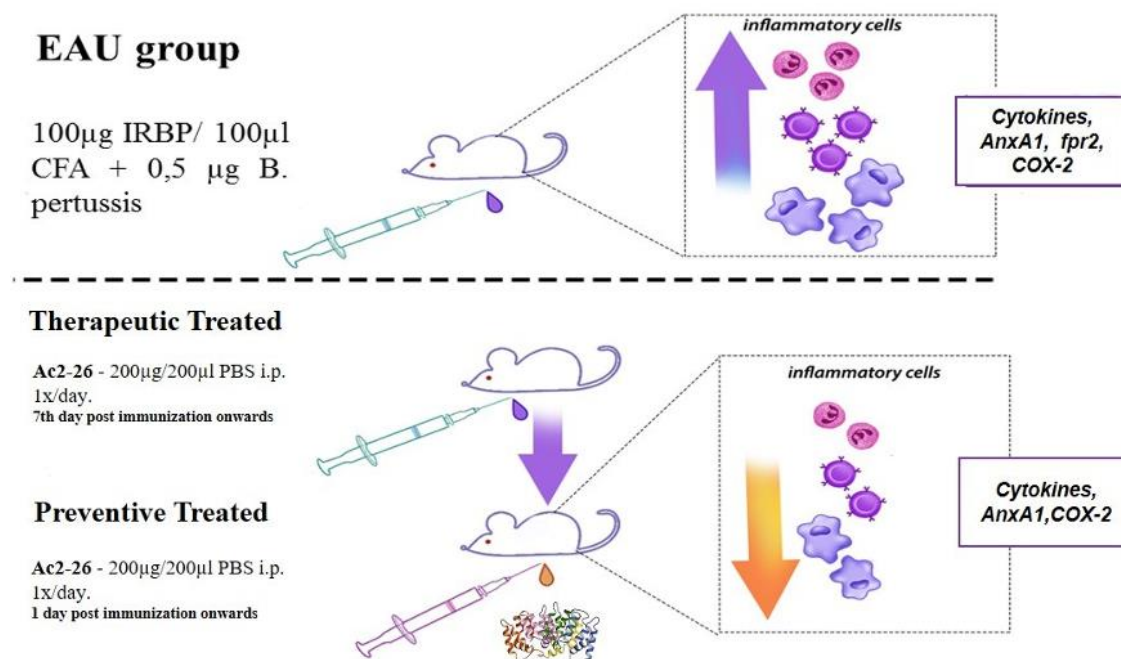
**Fig. 9. Medição de citocinas no macerado ocular.** Pró-inflamatório: IL-2 (A); IL-17 (B); IFN- $\gamma$  (C); TNF- $\alpha$  (D); MCP-1 (E), Anti-inflamatório: IL-4 (F) e IL-10 (G). Resultados apresentados como média  $\pm$  S.E.M. (n=10/grupo). \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01 e \* p<0,05 vs controle;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



Fonte: Elaborado pela autora



**Fig. 10. Graphical Abstract**



Fonte: Elaborado pela autora

## 5. 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- $\gamma$  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 interleukin-17 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<sup>+</sup> 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- $\gamma$  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.

**APÊNDICE A** – 1ª página do Artigo: “*Evaluation of Annexin A1 Protein in an Infectious Keratitis Model: Therapeutic Perspectives*”, publicado na Revista **CURRENT TRENDS IN OPHTHALMOLOGY**, v. 2, p. 104-112, 2019.

ISSN: 2637-6938



## Research Article

### Current Trends in Ophthalmology

# Evaluation of Annexin A1 Protein in an Infectious Keratitis Model: Therapeutic Perspectives

Da Silva RA<sup>1</sup>, Hamade AMA<sup>1</sup>, E Silva GAS<sup>1</sup>, Pereira GH<sup>1</sup>, De Oliveira FFJ<sup>1</sup>, De Costa SS<sup>1,2</sup>, Iyomasa-Pilon MM<sup>1</sup>, Souza HR<sup>1,2</sup>, Possebon L<sup>1,2</sup> and Girol AP<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>University Center Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biology, Laboratory of Immunomorphology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto Campus, Brazil

\***Correspondence:** Ana P Girol, University Center Padre Albino (UNIFIPA), Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, 15.809-144, Brazil, Tel: +55-17-3311-3340; E-mail: anapaulagirol@hotmail.com

Received: December 04, 2018; Accepted: January 03, 2018; Published: January 07, 2019

## Abstract

**Introduction:** bacterial keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* is one of the causes of blindness in the world, due to pathogenicity of the bacteria that can lead to corneal perforation. Studies on the protein annexin A1 (AnxA1) point it as one of the essential mediators in homeostasis of inflammation and ocular infections. However, there are no known reports of AnxA1 in keratitis. Objective: to investigate the expression profile of AnxA1 in the *P. aeruginosa*-induced keratitis model in two strains of mice (susceptible and pathogen resistant).

**Method:** for the development of experimental keratitis, the mice had their right eyes ulcerated and immediately inoculated with 5 µl of *P. aeruginosa* in PBS. The animals were euthanized after 24 hours of the bacteria inoculation. The eyes were clinically evaluated and histopathologically processed for quantitative analyses of the inflammatory infiltrate and immunohistochemical studies of the expressions of the AnxA1 and the receptor for formylated peptides (fpr2).

**Results:** our results demonstrated a higher influx of inflammatory cells, mainly neutrophils in the susceptible animals (C57BL / 6) compared to those considered resistant (BALB / c) and controls. Immunohistochemical studies indicated weak expression of AnxA1 and fpr2 in the anterior epithelium and stroma of the cornea. However, after keratitis induction, overexpression of AnxA1 and fpr2 occurred in the corneas of both mice strains. Furthermore, greater expression of AnxA1 in the anterior corneal epithelium was observed in the C57BL / 6 animals.

**Conclusions:** AnxA1 and fpr2 may be related to infectious keratitis induced by *P. aeruginosa*, which stimulates further investigations on the use of AnxA1 as a possible adjuvant therapeutic strategy in bacterial keratitis.

**Keywords:** Keratitis, AnxA1, *Pseudomonas aeruginosa*, Ocular inflammation

**Abbreviations:** Anxa1: Protein Annexin A1; Ac2-26: Peptide of Annexin A1; BALB/c: Mice; CEUA: Ethics Committee for the Use of Animals; CFU: Colony forming unit; C57BL/6: Mice; Fpr1: Formyl Peptide Receptor-1; Fpr2: Formyl Peptide Receptor-2; IL-8: Interleukin 8; LPS: Lipopolysaccharide; MIP-2: Macrophages inflammatory protein-2; PBS: Phosphate buffered saline; Th1: Lymphocytes T helper1; Th2: Lymphocytes T helper2

## Introduction

Bacterial keratitis is an important cause of visual loss and is frequently associated with changes in corneal

defense mechanisms. Immediate diagnosis and treatment can limit tissue loss, minimize scarring, and reduce the need for future surgery [1,2]. Several mycoorganisms are known as etiological agents of keratitis [2].





Article

## Annexin A1 Mimetic Peptide and Piperlongumine: Anti-Inflammatory Profiles in Endotoxin-Induced Uveitis

Ana Paula Girol <sup>1,2,3</sup> , Caroline de Freitas Zanon <sup>2</sup>, Ícaro Putinhon Caruso <sup>4</sup> , Sara de Souza Costa <sup>1,2</sup> , Helena Ribeiro Souza <sup>1,2</sup>, Marinônio Lopes Cornélio <sup>4</sup> and Sonia Maria Oliani <sup>2,3,5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Physical and Morphological Sciences, University Center Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva 15809-144, SP, Brazil; anapaula.girol@unifipa.com.br (A.P.G.); sarah\_sc\_0705@hotmail.com (S.d.S.C.); helena.souza@unifipa.com.br (H.R.S.)
- <sup>2</sup> Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), São Paulo State University, (UNESP), São José do Rio Preto 15054-000, SP, Brazil; carolfezanon@yahoo.com.br
- <sup>3</sup> Post Graduate Program in Structural and Functional Biology, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), Federal University of São Paulo, São Paulo 04023-062, SP, Brazil
- <sup>4</sup> Department of Physics, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), São Paulo State University, (UNESP), São José do Rio Preto 15054-000, SP, Brazil; icaro.caruso@unesp.br (I.P.C.); mariol.cornelio@gmail.com (M.L.C.)
- <sup>5</sup> Advanced Research Center in Medicine (CEPAM), União das Faculdades dos Grandes Lagos (Unilago), São José do Rio Preto 15030-070, SP, Brazil
- \* Correspondence: sonia.oliani@unesp.br; Tel.: +55-17-32212381; Fax: +55-17-32212390



**Citation:** Girol, A.P.; de Freitas Zanon, C.; Caruso, I.P.; de Souza Costa, 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**, *10*, 3170. <https://doi.org/10.3390/cells10113170>

Academic Editors: Maurice Pito and Joseph Bouskila

Received: 12 September 2021  
Accepted: 28 October 2021  
Published: 15 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Uveitis is one of the main causes of blindness worldwide, and therapeutic alternatives are worthy of study. We investigated the effects of piperlongumine (PL) and/or annexin A1 (AnxA1) mimetic peptide Ac2-26 on endotoxin-induced uveitis (EIU). Rats were inoculated with lipopolysaccharide (LPS) and intraperitoneally treated with Ac2-26 (200 µg), PL (200 and 400 µg), or Ac2-26 + PL after 15 min. Then, 24 h after LPS inoculation, leukocytes in aqueous humor, mononuclear cells, AnxA1, formyl peptide receptor (fpr)1, fpr2, and cyclooxygenase (COX)-2 were evaluated in the ocular tissues, along with inflammatory mediators in the blood and macerated supernatant. Decreased leukocyte influx, levels of inflammatory mediators, and COX-2 expression confirmed the anti-inflammatory actions of the peptide and pointed to the protective effects of PL at higher dosage. However, when PL and Ac2-26 were administered in combination, the inflammatory potential was lost. AnxA1 expression was elevated among groups treated with PL or Ac2-26 + PL but reduced after treatment with Ac2-26. Fpr2 expression was increased only in untreated EIU and Ac2-26 groups. The interaction between Ac2-26 and PL negatively affected the anti-inflammatory action of Ac2-26 or PL. We emphasize that the anti-inflammatory effects of PL can be used as a therapeutic strategy to protect against uveitis.

**Keywords:** eye inflammation; lipopolysaccharide; natural bioactive extracts; Ac2-26; FPR receptor; inflammatory mediators

### 1. Introduction

Uveitis is an intraocular inflammation of different etiologies [1–5] characterized by leukocyte accumulation in ocular tissues and cytokine release. It is a painful condition and is associated with redness, photophobia, impaired vision, and blindness [6–10].

Pharmacological treatment for uveitis includes corticosteroids, chemotherapeutic agents, and tumor necrosis factor (TNF)-α inhibitors [3,7,8,11], but the use of these drugs is limited by their serious side effects, such as increased ocular pressure or cytotoxicity [9,12]. However, recent advances in the mechanisms of inflammation and the discovery of several endogenous anti-inflammatory mediators have provided new therapeutic possibilities for uveitis treatment [5,7,10,13–15].

## ANEXO A – Aprovação da CEUA



Faculdades Integradas “Padre Albino”  
Comissão de Ética para o Uso de Animais  
Rua dos Estudantes, 225 – Catanduva – SP – CEP: 15.809-144  
Fone: (17) 3311-3229 – 3311-3340 – e-mail: [ceua@fipa.com.br](mailto:ceua@fipa.com.br)




### C E R T I F I C A D O

Nº 01/14

Certificamos que o Trabalho (**Protocolo nº 14.05.12-06**), intitulado: **“Avaliação da proteína anti-inflamatória Anexina A1 em administrações preventiva e terapêutica na uveíte autoimune experimental”**, de autoria da **Profa. Dra. Ana Paula Girol**, foi **APROVADO** sob o **Registro nº 01/14**, em 17/06/2014, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) das Faculdades Integradas Padre Albino - FIPA – Catanduva – SP.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA, os relatórios parciais e/ou final do desenvolvimento do Projeto de Pesquisa.

Catanduva (SP), 17 de junho de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Ana Paula Girol**  
Coordenadora da CEUA-FIPA

CEUA - FIPA

## ANEXO B – Comprovante de Submissão do Manuscrito

### Experimental Eye Research Anti-inflammatory profile of Ac2-26 peptide in preventive and therapeutic treatments in experimental autoimmune uveitis --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Keywords:</b>	ocular inflammation; autoimmune uveitis; Ac2-26; inflammatory mediators
<b>Corresponding Author:</b>	Ana Paula Gírol, PhD Centro Universitário Padre Albino Catanduva, São Paulo BRAZIL
<b>First Author:</b>	Sara de Souza Costa
<b>Order of Authors:</b>	Sara de Souza Costa Lucas Possedon Jéssica Massias da Silva Ariane Harumi Yoshikawa Meline Mizusaki Iyomasa Pilon Maria Elizabeth Jimenes de Campos Sonia Maria Oliari Ana Paula Gírol, PhD
<b>Abstract:</b>	<p>Uveitis is associated with several autoimmune diseases, being one of the main causes of blindness in the world. In recent years, the role of the anti-inflammatory protein annexin A1 (AnxA1) in ocular inflammatory processes has been investigated in vivo and in vitro, and AnxA1 is pointed out as one of the essential mediators in the homeostasis of the inflammatory process. Thus, the objective of this work was to investigate, in vivo, in the experimental autoimmune uveitis (EAU), the effects of the Ac2-26, an AnxA1 mimetic peptide, administered in prevention and therapeutic protocols. Lewis rats were divided into induced-untreated (EAU), treated preventively (IP) or therapeutically (T) and control (C) groups. The animals were inoculated in the right paw with bovine interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in complete Freund's adjuvant emulsion. Simultaneously, an intraperitoneal (i.p.) injection containing Bordetella pertussis toxin was administered as an additional adjuvant. Treated animals received Ac2-26 by i.p. daily from day 1 to day 13 post-immunization (IP) and from day 8 to day 13 post-immunization (T). Animals without manipulation were used as a control group. EAU severity was assessed daily in all groups. 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 verified by Western blotting. The cytokines interferon (IFN)-<math>\gamma</math>, tumor necrosis factor (TNF)-<math>\alpha</math>, interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-17 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 were measured in the ocular macerate supernatant. Clinically, the eyes of the EAU-induced rats showed altered macroscopic characteristics, and in the treated groups, normal parameters were reestablished, observing greater similarity of the preventive group in relation to the control group. Leukocytes, predominantly lymphocytes, were found in the untreated-EAU group, while the quantification of CD4+, CD8+ and ED1 showed a reduction of these cells in the treated animals. Similarly, treatment with Ac2-26 reduced the expression of AnxA1, fpr2 and COX-2 in ocular segments and supernatants. Furthermore, reduced levels of IL-2, IFN-<math>\gamma</math> and IL-10 occurred in the groups that received mimetic peptide treatment compared to untreated animals. Our results indicate that the administration of Ac2-26 promoted effective anti-inflammatory effects in this experimental autoimmune uveitis model, with potential for therapeutic application.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	Cristiane Gil, PhD Unifesp EPM, Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation