ANEXINA-1: 2º MENSAGEIRO DAS ACÇÕES ANTI-INFLAMATÓRIAS DOS GLUCOCORTICÓIDES

Margarida Castro-Caldas

Secção Autónoma de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; Unidade de Biologia Molecular e Biopatologia Experimental, Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa

RESUMO

As hormonas glucocorticóides possuem importantes propriedades anti-inflamatórias, sendo utilizadas na clínica como terapêutica de uma série de patologias de carácter inflamatório e auto-imune. Um dos mecanismos mais bem estudados através do qual os glucocorticóides exercem grande parte das acções imunossupressoras envolve a indução da síntese e secreção da proteína mediadora e efectora anti-inflamatória anexina 1 (ANXA1). Neste trabalho efectuamos uma revisão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na síntese e secreção da ANXA1 em vários tipos de células, em resposta à exposição a glucocorticóides.

A ANXA1 foi originalmente identificada como uma proteína inibidora da actividade da enzima fosfolipase A2. Rapidamente, muitas outras funções foram atribuídas à ANXA1, sendo as mais relevantes directamente envolvidas na modulação da resposta inflamatória. Os resultados apresentados nesta pesquisa abrem novas perspectivas no sentido da execução de estudos farmacológicos que permitam a identificação da participação da ANXA1 em doenças de caracter inflamatório, designadamente a artrite reumatóide.

Palavras-Chave: Anexina-1; Glucocorticóides; Resposta Inflamatória; Artrite Reumatóide.

ABSTRACT

Glucocorticoids have important immunosupressive properties, being used as anti-inflammatory therapeutic agents in a wide range of inflammatory and auto-immune pathologies. One of the best studied mechanisms by which glucocorticoids exert most of their anti-inflammatory actions involves the induction of the synthesis and the secretion of the mediator and effector protein annexin 1 (ANXA1). Here we review the molecular and cellular pathways involved on the glucocorticoid-induced synthesis and secretion of ANXA1 in a variety of cell types.

Since its discovery as an anti-phospholipase A2 protein, ANXA1 has come a long way to encompass a wide range of cellular effects, the most relevant ones being those that directly modulate the inflammatory response. The results presented in this review open the way to further pharmacological studies which will allow the identification of the role of ANXA1 in inflamatory pathologies, namely rheumatoid arthritis.

Key-Words: Annexin 1; Glucocorticoids; Inflammatory Response; Rheumatoid Arthritis.

ANEXINA-1: 2º MENSAGEIRO DAS ACÇÕES ANTI-INFLAMATÓRIAS DOS GLUCOCORTICÓIDES

Margarida Castro-Caldas*

Introdução

No desenvolvimento de um processo inflamatório, o mecanismo através do qual o organismo se defende contra agentes lesivos e repara o tecido danificado designa-se por resposta inflamatória. Durante a resposta inflamatória são activadas um conjunto de vias anti-inflamatórias que regulam e controlam essa resposta. Deste modo, o processo de controlo da inflamação resulta do balanço entre a actividade das vias pró-inflamatórias e os mediadores anti-inflamatórios que operam no sentido de iniciar, manter e finalmente resolver a reacção inflamatória.

As hormonas glucocorticóides (GCs) estão directamente envolvidas na resposta inflamatória, actuando através de uma multiplicidade de mecanismos que envolvem a inibição da actividade e/ou da expressão de mediadores pró-inflamatórios. A maioria dos efeitos imunossupressores dos GCs ocorrem por intermédio de mediadores anti-inflamatórios, cuja síntese é induzida pelos próprios GCs. Entre as proteínas envolvidas nos efeitos dos GCs destaca-se em particular a anexina 1 (ANXA1), uma proteína mediadora endógena da maioria das acções anti-inflamatórias dos GCs.[1-3]

Estrutura da anexina 1

A ANXA1 é uma proteína de 37 kDa da superfamília das anexinas, que inicialmente teve várias designações, de acordo com o tipo celular em que esta proteína foi identificada. Assim, as proteínas designadas por macrocortina,[4] lipomodulina,[4] renocortina,[5] calpactina II,[6] cromobindina IX[7] e calcimedina,[8] que possuem propriedades físicas, funcionais e biológicas semelhantes entre si, actualmente estão todas incluídas na designação de lipocortina 1, ou ANXA1.[5,9,10] A designação anexina deriva do termo «anexar» e exprime algumas das funções que estas proteínas exercem. Por exemplo, a ANXA1 facilita as interacções macromoleculares juntando domínios estruturais distintos através da sua ligação a fosfolípidos membranares.[11,12]

A superfamília das anexinas é constituída, no mínimo, por 13 proteínas relativamente abundantes e estruturalmente semelhantes.[13-15] Estas proteínas têm em comum a capacidade de ligação a fosfolípidos, um processo que ocorre de uma forma dependente de Ca^{2+}.[16,17] Contudo, apesar das semelhanças estruturais, as anexinas variam entre si relativamente a, pelo menos, duas propriedades: a concentração de Ca^{2+} necessária para a ligação aos fosfolípidos e a afinidade para os diferentes tipos de fosfolípidos.[18] Portanto, os diversos tipos de anexinas diferem também relativamente à sua localização celular e à função biológica que desempenham.

Estruturalmente, as anexinas são constituídas por uma cauda, na proximidade da extremidade amina, que apresenta características variáveis de acordo com o tipo de proteína, e por uma região com maior grau de conservação entre os membros da família das anexinas, na proximidade da extremidade carboxílica[19] (Figura 1). Esta última região contém quatro a oito repetições de uma sequência

*Secção Autónoma de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; Unidade de Biologia Molecular e Biopatologia Experimental, Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.
Bolsa que contribuiu para parte da realização do trabalho: atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BPD/14600/2003)

Abreviaturas

ANXA1 – anexina-1; AR – artrite reumatóide; CRE – elemento de resposta para o AMPc; CREB – proteínas com afinidade para o elemento de resposta para o AMPc; Dex – dexametasona; GC – glucocorticóide; GR – receptor de glucocorticóide; GRE – elemento de resposta para glucocorticóides; IL – interleucina; iNOS – isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto; NFIL-6 – proteínas com afinidade para o elemento de resposta para a IL-6; PLA2 – fosfolipase A2.

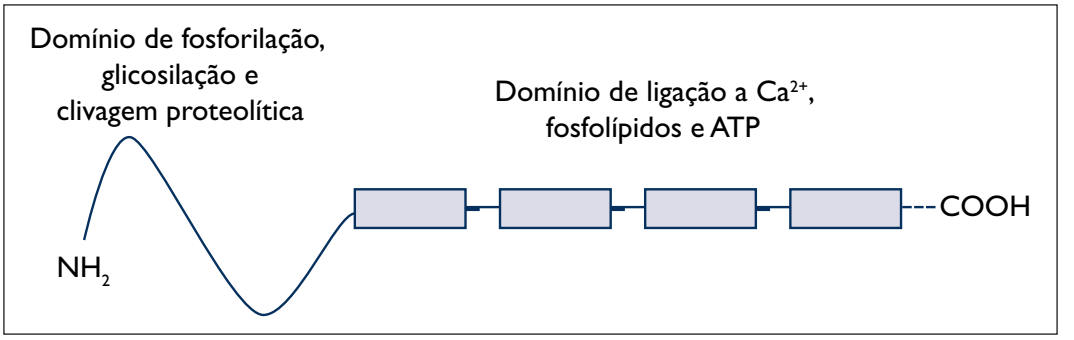

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da ANXA1. A região da extremidade amina, contendo os locais de fosforilação, glicosilação e clivagem proteolítica, constitui a região reguladora da ANXA1. A região próxima da extremidade carboxílica contém quatro repetições de uma sequência de cerca de 70 aminoácidos, onde se encontram os locais de ligação a Ca2+, fosfolípidos e ATP, e constitui a região conservada das proteínas da superfamília das anexinas. (Adaptado de 18).

de cerca de 70 aminoácidos, que constitui a estrutura primária comum de ligação ao Ca^{2+}, a fosfolípidos e também ao ATP.[16] A região próxima da extremidade amina apresenta grande diversidade entre os vários elementos desta família de proteínas e contém os locais para a fosforilação, glicosilação, acção de peptidases e clivagem proteolítica selectiva.[19-21] Este domínio consiste, portanto, na região reguladora da proteína, pois nele reside a especificidade das várias anexinas nas células.

A concentração intracelular de ANXA1 varia significativamente consoante o tipo de célula, constituindo normalmente 0,5% a 2% do total das proteínas da célula.[16,22-24] No entanto, o conteúdo intracelular de ANXA1 é particularmente abundante, podendo atingir cerca de 4% das proteínas solúveis totais, nas células directamente envolvidas na resposta inflamatória, tais como os monócitos, os macrófagos e os neutrófilos do sangue periférico.[25,26]

Expressão da anexina 1

A expressão da ANXA1, induzida por GCs endógenos tem sido estudada em diversos sistemas celulares *in vivo* e *in vitro*. Parecem ser particularmente sensíveis ao efeito dos GCs as células da microglia,[27] as células do sistema neuroendócrino[28] e principalmente os leucócitos do sangue periférico humano.[25,26] À semelhança dos GCs endógenos, os GCs exógenos, nomeadamente a dexametasona (Dex), também induzem a expressão de ANXA1 (RNAm e proteína) em muitos tipos de células, tais como neutrófilos,[29,30] monócitos,[23,26] macrófagos[25,31] e linfócitos.[32]

Embora a ANXA1 seja considerada uma proteína cuja síntese induzida depende maioritariamente de GCs, em alguns modelos celulares foi demonstrado que outros factores, além dos GCs, podem ser responsáveis pela indução da síntese de ANXA1.

A transcrição do gene que codifica a ANXA1 é regulada por dois sistemas: o constitutivo e o indutível.[24] A região de regulação constitutiva é importante para iniciar o processo de transcrição e para a manutenção da expressão basal, ou constitutiva, da ANXA1. *In vitro*, a expressão constitutiva da ANXA1 pode ser activada continuamente por factores presentes no soro.[24]

O sistema de regulação indutível é bastante mais complexo. Estudos da região promotora do gene da ANXA1 indicam que este gene contém dois elementos de resposta para GCs («GC responsive element», GRE), o que poderá explicar, pelo menos em parte, o aumento da síntese de ANXA1 em resposta a GCs.[24,33,34] Efectivamente, vários trabalhos demonstram que a síntese de ANXA1, induzida pelos GCs, é mediada por mecanismos que dependem da ligação do complexo GC-Receptor de GC (GR) ao DNA, com consequente aumento da transcrição do gene que codifica a ANXA1.[23,33,35,36] No entanto, o envolvimento dos GREs presentes no promotor do gene que codifica a ANXA1 na síntese de ANXA1 induzida por GCs, é ainda discutível. Por exemplo, em modelos *in vitro* utilizando as células A431 e JEG3, não se verificou a ligação do complexo GC-GR ao GRE,[34,37] enquanto que nas células A549 a delecção da região contendo os GREs não alterou a resposta aos GCs.[24] Estas observa-

ções levaram alguns autores a sugerir que os GREs presentes no gene que codifica a ANXA1 são não--funcionais.

Em conjunto, estas observações indicam que, se em alguns casos o aumento da síntese de ANXA1, em resposta aos GCs, se processa por mecanismos mediados pela ligação do complexo GC-GR a GREs, noutros casos, a regulação da transcrição do gene da ANXA1 pelos GCs terá de envolver mecanismos moleculares alternativos. Efectivamente, foi demonstrado que o gene que codifica a ANXA1 contém no seu promotor outras regiões reguladoras, para além dos GREs. Por exemplo, o gene da ANXA1 contém um elemento de resposta para o AMPc («cAMP responsive element», CRE) para o qual tem afinidade uma família de proteínas que funciona como factor de transcrição («cAMP responsive element-binding protein», CREB),[34] e outra região regulada pelo factor de transcrição com afinidade para o elemento de resposta para a IL-6 («nuclear factor-IL-6», NFIL-6).[24] Em concordância com estas observações, verificou-se que os GCs podem induzir o aumento da síntese da ANXA1 por mecanismos envolvendo uma interferência, directa ou indirecta, com a actividade dos factores de transcrição CREB e NFIL-6.[24,34,38]

Deste modo, os mecanismos envolvidos na indução da síntese de ANXA1 pelos GCs são complexos. Aparentemente, em alguns tipos de células, esses mecanismos são regulados pela ligação do complexo GC-GR aos GREs presentes na região promotora do gene da ANXA1. Em alternativa, os GCs podem activar, directa ou indirectamente, outros factores de transcrição, designadamente o CREB e o NFIL-6, que regulam, eles próprios, a expressão do gene da ANXA1.

Secreção da anexina 1

O processo de exportação celular da ANXA1, em resposta a GCs, também designado por externalização ou secreção, é relativamente rápido, e é normalmente seguido pela síntese *de novo* da proteína, o que permite manter os níveis basais do conteúdo intracelular de ANXA1.[2,39,40] No entanto, na presença continuada de GCs ocorrem os processos de secreção e de síntese da ANXA1 em paralelo e, consequentemente, uma parte da ANXA1 sintetizada *de novo* é exportada para o espaço extracelular.[41]

O mecanismo pelo qual a ANXA1 é segregada, em resposta aos GCs, ainda não foi totalmente esclarecido. A ANXA1, ao contrário da maioria das proteínas segregadas, não possui a sequência sinal hidrofóbica, constituída por 13 a 30 aminoácidos, e responsável pelo direccionamento das proteínas para o retículo endoplasmático.[42] Além disso, alguns estudos demonstraram que a inibição da via clássica de secreção de proteínas, com inibidores farmacológicos específicos, não impediu a secreção da ANXA1.[40,42,43] Desta forma, pensa-se que seja improvável que a ANXA1 entre no sistema retículo endoplasmático-aparelho de Golgi para ser libertada pela via clássica de secreção vesicular.

Várias vias alternativas à via clássica de secreção de proteínas foram propostas para explicar a secreção da ANXA1 com base nos resultados obtidos em diferentes modelos celulares.[2,40,43] No entanto, apesar das vias alternativas propostas terem sido identificadas e caracterizadas, ainda não existe um consenso, uma vez que parece haver grande variabilidade na via intracelular de secreção utilizada pela ANXA1. Esta variabilidade não permitiu que se identificasse ainda o mecanismo geral utilizado pela ANXA1 no decorrer do seu processo de externalização.

Está, no entanto, bem definido que a secreção da ANXA1 constitui um passo fundamental para o desempenho da sua acção anti-inflamatória, pois permite que a proteína se ligue, de forma autócrina ou parácrina, a receptores específicos localizados na face externa da membrana plasmática das células alvo.[2,28,41]

A expressão de receptores específicos para a ANXA1 é particularmente abundante na membrana plasmática de macrófagos,[36] monócitos e neutrófilos.[14,36,41,44]

Desta forma, embora a ANXA1 seja fundamentalmente uma proteína reguladora de processos intracelulares, a capacidade das células para segregarem a proteína para o meio extracelular, faz com que a ANXA1 extracelular desempenhe também importantes funções biológicas. De facto, numerosos estudos mostram que algumas das acções anti-inflamatórias dos GCs se desencadeiam quando a ANXA1 se encontra ligada a receptores membranares, o que ocorre após a proteína ter sido libertada em resposta aos GCs.[1,42,45] A importância da ligação ANXA1-receptor como uma etapa crítica e fundamental para a concretização de grande parte das acções biológicas da ANXA1 é demonstrada pelas seguintes evidências: *i*) a administração de anticorpos específicos anti-ANXA1,

para os quais a membrana plasmática é impermeável, resultou na inibição de alguns dos efeitos anti-inflamatórios dos GCs[31]; *ii*) a administração de ANXA1 inactivada, por alteração da sua conformação tri-dimensional, impediu a actividade biológica da ANXA1 endógena extracelular, uma vez que a proteína inactivada competiu com a proteína endógena para a ligação ao receptor[46]; *iii*) a administração de derivados peptídicos com uma extremidade amina idêntica à da ANXA1, que também não possuem a capacidade de atravessar a membrana plasmática, resultou na activação de funções anti-inflamatórias equivalentes às da ANXA1 endógena.[42]

Funções celulares da anexina 1

A ANXA1 é uma proteína com funções biológicas de carácter fundamentalmente anti-inflamatório. Além disso, uma vez que os GCs induzem a síntese e secreção da ANXA1 na maioria das células, esta proteína é considerada a principal mediadora, ou efectora, das acções anti-inflamatórias das hormonas GCs endógenas e dos GCs exógenos, particularmente a Dex.

Inicialmente, a ANXA1 foi descrita como a proteína responsável pela inibição da actividade da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2), após o tratamento das células com GCs.[30,47,48] A inibição da actividade da PLA_2, concretamente da $cPLA_2$ por interacção proteína-proteína, constitui um mecanismo anti-inflamatório crucial, pois tem como consequência a inibição da libertação dos mediadores pró-inflamatórios, prostaglandinas, leucotrienos e factor de agregação plaquetar.[19]

Posteriormente, numerosos estudos têm vindo a demonstrar que a ANXA1 está envolvida, como proteína efectora, em muitas outras acções anti-inflamatórias dos GCs (Figura 2). Na resposta inflamatória, destaca-se o papel da ANXA1 na inibição do processo de transmigração dos leucócitos polimorfonucleares através da camada de células endoteliais,[15,49,50] bem como na inibição da migração destas células para locais de inflamação,[51] em parte, através de mecanismos que envolvem a inibição da molécula de adesão celular, CAM («cellular adhesion molecule»).[52] Os efeitos dos GCs na inibição da síntese de mediadores inflamatórios, tais como o TNF-α, a IL-1 e a IL-6, bem como na inibição da expressão das enzimas ciclo-oxigenase 2 e isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS) também são mediados pela ANXA1.[41,53,54]

Além disso, a ANXA1 está também envolvida na estimulação da libertação de IL-10, na activação de receptores do peptídeo formilo e de receptores de lipoxina A_4, na indução da apoptose de células inflamatórias bem como na remoção de células e corpos apoptóticos.[55]

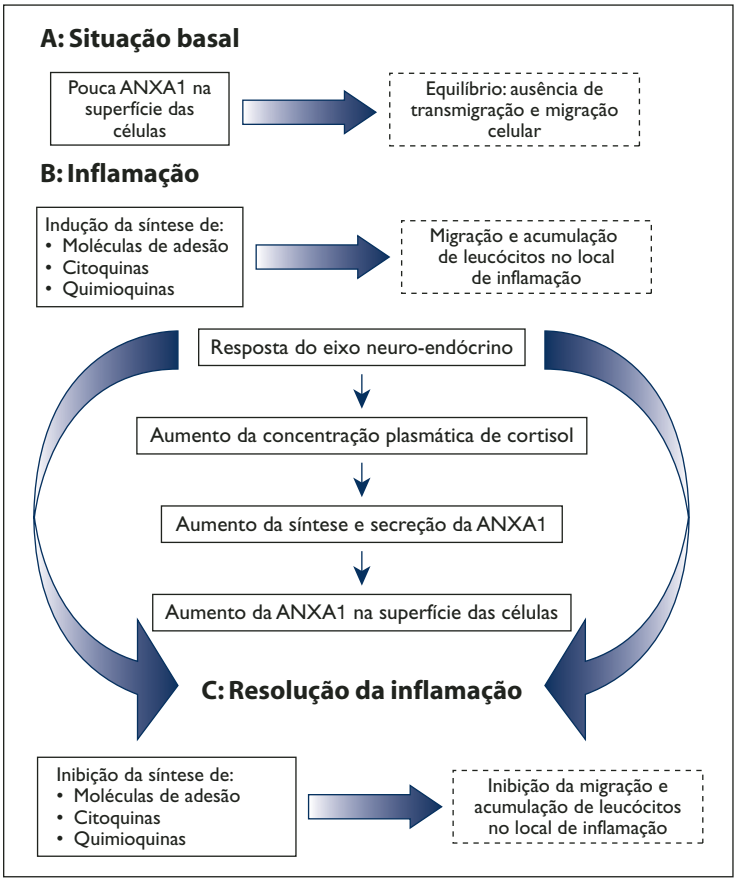

Figura 2. Representação esquemática de um modelo de regulação da resposta inflamatória envolvendo a ANXA1. (Adaptado de 44 e 51).

Relevância clínica da anexina 1

A artrite reumatóide (AR) é a doença mais bem estudada, no que respeita ao potencial envolvimento da AN-

XA1 na modulação de condições fisiológicas humanas. Por exemplo, ensaios em modelos animais de artrite experimental demonstraram que a sequência peptídica da extremidade amina da ANXA1 mimetizou as acções anti-inflamatórias dos GCs,[56,57] e que, por outro lado, anticorpos anti-ANXA1 exacerbaram a doença.[41,45,58] Adicionalmente, nos modelos referidos, a ANXA1 mostrou-se essencial e necessária para o efeito anti-inflamatório da Dex, uma vez que a neutralização da ANXA1 inibiu os efeitos deste GC sintético.[41,56,57]

No entanto, a hipótese de que a ANXA1 medeia as acções anti-inflamatórias dos GCs na AR surgiu após a detecção da proteína e dos seus receptores em sinoviócitos e em leucócitos de doentes com AR.[59-61] Nestas células de doentes com AR verificou-se uma diminuição muito significativa da expressão da ANXA1 a nível do RNAm e da proteína, bem como a depleção de um número significativo de receptores para ANXA1, relativamente aos valores encontrados em indivíduos controlo.[26,57,62] Estas observações, em conjunto com resultados de estudos em que foram identificados auto-anticorpos anti-ANXA1 em doentes com AR resistente a GCs[26,58] vieram revelar um papel preponderante da ANXA1 no desenvolvimento da AR. Apesar dos mecanismos subjacentes ao papel da ANXA1 no desenvolvimento da AR serem ainda em parte desconhecidos, os dados da literatura disponíveis até à data indicam que a ANXA1 funciona como um importante mensageiro secundário dos GCs cuja função biológica se encontra largamente alterada neste tipo de patologia. Além disso, resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* realizados pelo nosso grupo mostraram, pela primeira vez, que a hormona sexual feminina 17β-Estradiol em concentrações supra-fisiológicas, tais como as encontradas na gravidez, induz eficazmente a secreção e a síntese *de novo* da ANXA1.[63] Em concentrações plasmáticas na ordem micramolar, o 17β-Estradiol tem a capacidade de inibir um conjunto de processos inflamatórios, através de efeitos biológicos semelhantes a alguns efeitos dos GCs que se sabe serem mediados pela ANXA1[13,41,64,65]. Assim, os nossos resultados sugerem que, para além de mediar alguns dos efeitos dos GCs, a ANXA1 poderá também *in vivo* mediar certas acções anti-inflamatórias do 17β-Estradiol. Dada a importância assumida pela ANXA1 no desenvolvimento da AR, estes dados poderão, em parte, explicar as flutuações da sintomatologia da doença de acordo com alterações da concentração hormonal.[65-67]

A eficácia dos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos GCs no tratamento de patologias, tais como a AR, sugere que um avanço significativo, nos próximos anos, seria o desenvolvimento de moléculas mais selectivas que as actuais, com menor toxicidade associada a efeitos pleiotrópicos secundários. Assim, o desenvolvimento de novos GCs que exerçam menos efeitos secundários depende directamente de um esclarecimento mais aprofundado do mecanismo molecular de acção dos GCs e dos factores associados à resistência a GCs.

A toxicidade associada aos efeitos secundários dos GCs aparentemente envolve mecanismos moleculares distintos dos que estão implicados nos efeitos imunomoduladores. Provavelmente, o principal mecanismo através do qual os GCs exercem as suas acções anti-inflamatórias envolve a inibição da expressão génica (transrepressão). Por outro lado, a transactivação induzida pelos GCs poderá mediar os efeitos secundários indesejados destas moléculas.[68,69] No entanto, há que salientar que esta dicotomia não é linear, uma vez que a expressão da ANXA1, bem como de outros mediadores com papel claramente anti-inflamatório, é regulada positivamente na presença de GCs. Por este motivo, apesar dos avanços científicos alcançados, é ainda prematuro sugerir que os efeitos terapêuticos e os efeitos secundários dos GCs são mediados por mecanismos moleculares distintos e que é possível desenhar um ligando que induza apenas os efeitos desejados. Assim a aposta está no desenvolvimento de ligandos sintéticos que activem maioritariamente as vias imunomoduladoras. Tais fármacos deverão mimetizar os efeitos benéficos dos GCs naturais minimizando os efeitos pleiotrópicos indesejados.

Paralelamente, a resistência a GCs é um problema significativo no tratamento de doenças inflamatórias. Estudos recentes indicam que a resistência à terapêutica com GCs de pacientes com AR poderá estar correlacionada com elevados níveis de expressão de GRβ,[70] uma menor expressão de GRα[70] e/ou um aumento da fosforilação do GR[71] e consequente inibição da sinalização induzida por GCs endógenos e exógenos. Curiosamente, auto-anticorpos anti-ANXA1 ocorrem naturalmente em pacientes com doenças inflamatórias crónicas tais como a AR, e este fenómeno tem sido considerado também como um tipo de resistência a GCs.[58]

Tendo em consideração estes factos, o tratamento eficaz de doenças inflamatórias como a AR

poderá ser assegurado por mediadores a jusante, com eventual diminuição dos efeitos secundários indesejados. Neste contexto, a administração de análogos da ANXA1, bem como a manipulação da expressão da ANXA1, poder-se-ão revelar importantes estratégias no tratamento da AR, bem como de outras doenças inflamatórias. A importância da ANXA1 como mediadora dos GCs em doenças inflamatórias é corroborada por ensaios *in vivo* que demonstraram que a adição de ANXA1 exógena exerce efeitos antipiréticos, anti-isquémicos e inibe a migração de células do sangue periférico e a expressão da iNOS.[72] Além disso, tendo em consideração que parte do tratamento de doenças inflamatórias envolve a inibição das vias da lipoxigenase e cicloxigenase, estudos efectuados *in vitro* indicam que a adição de ANXA1 exógena inibe eficazmente a actividade da PLA_2, possuindo por si só uma potente actividade anti-inflamatória.[73] Finalmente, murganhos de uma linhagem com deleção do gene da ANXA1 ($ANXA1^{-/-}$), que consequentemente não expressam a ANXA1 endógena, apresentam elevados níveis basais de actividade da PLA_2, uma resposta inflamatória exacerbada e resistência parcial aos efeitos anti-inflamatórios dos GCs.[74]

Apesar de nestes estudos *in* vivo referenciados não terem sido referidos efeitos secundários associados à aplicação de ANXA1 exógena, é ainda necessário identificar parte das vias de sinalização intracelular envolvidas na inflamação e na resposta inflamatória exercida pela ANXA1, de modo a garantir a diminuição dos efeitos indesejáveis associados à terapêutica com GCs.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/ /BPD/14600/2003).

Endereço para correspondência:

Secção Autónoma de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; Unidade de Biologia Molecular e Biopatologia Experimental, Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa
Av. Prof. Gama Pinto
1649-003 Lisboa
Telefone: 21 7946496 – Fax: 21 7946491
E-mail: mcastrocaldas@ff.ul.pt

Referências

1. Smith SF. Lipocortin 1: glucocorticoids caught in the act? Thorax 1996; 51: 1057-1059.
2. Buckingham JC, Flower RJ. Lipocortin 1: a second messenger of glucocorticoid action in the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Mol Med Today 1997; 3: 296-302.
3. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. Mem Inst Cruz 2005; 100: 39-48.
4. Errasfa M, Rothhut B, Fradin A, et al. The presence of lipocortin in human embryonic skin fibroblasts and its regulation by anti-inflammatory steroids. Biochim Biophys Acta 1985; 847: 247-254.
5. Rothhut B, Russo-Marie F, Wood J, DiRosa M, Flower RJ. Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase protein «renocortin». Biochem Biophys Res Commun 1983; 117: 878-884.
6. Glenney J. Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca2+-dependent manner. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4258--4262.
7. Creutz CE, Dowling LG, Sando JJ, Villar-Palasi C, Whipple JH, Zaks WJ. Characterization of the chromobindins. Soluble proteins that bind to the chromaffin granule membrane in the presence of Ca2+. J Biol Chem 1983; 258: 14664-14674.
8. Moore PB, Dedman JR. Calcium-dependent protein binding to phenothiazine columns. J Biol Chem 1982; 257: 9663-9667.
9. Hirata F, Notsu Y, Iwata M, et al. Identification of several species of phospholipase inhibitory protein(s) by radioimmunoassay for lipomodulin. Biochem Biophys Res Commun 1982; 109: 223-230.
10. DiRosa M, Flower RJ, Hirata F, Parente L, Russo-Marie F. Anti-phospholipase proteins. Prostaglandins 1984; 28: 441-442.
11. Swairjo MA, Seaton BA. Annexin structure and membrane interactions : a molecular perspective. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1994; 23: 193-213.
12. Mollenhauer J. Annexins: what are they good for? Cell Mol Life Sci 1997; 53: 506-507.
13. Perretti M, Flower RJ. Cytokines, glucocorticoids and lipocortins in the control of neutrophil migration. Pharmacol Res 1994; 30: 53-59.
14. Goulding NJ, Pan L, Wardwell K, Guyre VC, Guyre PM. Evidence for specific annexin I-binding proteins on human monocytes. Biochem J 1996; 316: 593-597.
15. Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. Inflamm Res 1998; 47: S158-165.
16. Raynal P, Pollard H. The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta 1994; 1197: 63-93.
17. Gerke V, Moss SE. Annexins and membrane dynamics. Biochim Biophys Acta 1997; 1357: 129-154.
18. Ernst JD, Mall A, Chew G. Annexins possess functionally distinguishable Ca2+ and phospholipid binding domains. Biochem Biophys Res Commun 1994; 200: 867-876.

19. Kim SW, Ko J, Kim JH, Choi EC, Na DS. Differential effects of annexins I, II, III and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model. FEBS Lett 2001; 489: 243-248.
20. Chuah SY, Pallen CJ. Calcium-dependent and phosphorylation-stimulated proteolysis of lipocortin I by an endogenous A431 cell membrane protease. J Biol Chem 1989; 264: 21160-21166.
21. Lee KH, Na DS, Kim JW. Calcium-dependent interaction of annexin I with annexin II and mapping of the interaction sites. FEBS Lett 1999; 442: 143-146.
22. Pepinsky RB, Sinclair LK, Browning JL, et al. Purification and partial sequence analysis of a 37-kDa protein that inhibits phospholipase A2 activity from rat peritoneal exudates. J Biol Chem 1986; 261:4239--4246.
23. Vishwanath BS, Frey FJ, Bradbury M, Dallman MF, Frey BM. Adrenalectomy decreases lipocortin-I messenger ribonucleic acid and tissue protein content in rats. Endocrinology 1992; 130: 585-591.
24. Solito E, De Coupade C, Parente L, Flower RJ, Russo-Marie F. Human annexin 1 is highly expressed during the differentiation of the epithelial cell line A 549: involvement of nuclear factor interleukin 6 in phorbol ester induction of annexin 1. Cell Growth Differ 1998; 9: 327-336.
25. Goulding NJ, Godolphin JL, Sharland PR, et al. Anti-inflammatory lipocortin-1 production by peripheral blood leukocytes in response to hydrocortisone. Lancet 1990; 335: 1416-1418.
26. Morand EF, Jefferiss CM, Dixey J, Mitra D, Goulding NJ. Impaired glucocorticoid induction of mononuclear leukocyte lipocortin-1 in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1994; 37: 207-211.
27. Go KG, Ter Haar JG, De Ley L, et al. The effect of steroid treatment on lipocortin immunoreactivity of rat brain. Med Inflamm 1994; 3: 177-180.
28. Taylor AD, Philip JG, John CD, et al. Annexin 1 (lipocortin 1) mediates the glucocorticoid inhibition of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated prolactin secretion. Endocrinology 2000; 141: 2209--2219.
29. Hirata F, Schiffmann E, Venkatasubramanian K, Salomon D, Axelrod J. A phospholipase A2 inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 2533-2536.
30. Fradin A, Rothhut B, Poincelot-Canton B, Errasfa M, Russo-Marie F. Inhibition of eicosanoid and PAF formation by dexamethasone in rat inflammatory polymorphonuclear neutrophils may implicate lipocortin's'. Biochim Biophys Acta 1988; 963: 248-257.
31. Croxtall JD, Flower RJ. Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 3571-3575.
32. Almawi WY, Saouda MS, Stevens AC, Lipman ML, Barth CM, Strom TB. Partial mediation of glucocorticoid anti-proliferative effects by lipocortins. J Immunol 1996; 157: 5231-5239.
33. Peers SH, Smillie F, Elderfield AJ, Flower RJ. Glucocorticoid- and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leucocytes in vivo. Br J Pharmacol 1993; 108: 66-72.
34. Antonicelli F, De Coupade C, Russo-Marie F, Le Garrec Y. CREB is involved in mouse annexin A1 regulation by cAMP and glucocorticoids. Eur J Biochem 2001; 268: 62-69.
35. Suarez F, Rothhut B, Coméra C, Touqui L, Marie FR, Silve C. Expression of annexin I, II, V, and VI by rat osteoblasts in primary culture: stimulation of annexin I expression by dexamethasone. J Bone Miner Res 1993; 8: 1201-1210.
36. Perretti M, Flower RJ. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. Br J Pharmacol 1996; 118: 605-610.
37. Donnelly SR, Moss SE. Functional analysis of the human annexin I and VI gene promoters. Biochem J 1998; 332: 681-687.
38. Castro-Caldas M, Mendes AF, Carvalho AP, Duarte CB, Lopes MC. Dexamethasone-induced and estradiol-induced CREB activation and annexin 1 expression in CCRF-CEM lymphoblastic cells: evidence for the involvement of cAMP and p38 MAPK. Med Inflamm 2003; 12: 329-337.
39. Croxtall JD, Flower RJ. Antisense oligonucleotides to human lipocortin-1 inhibit glucocorticoid-induced inhibition of A549 cell growth and eicosanoid release. Biochem Pharmacol 1994; 48: 1729-1734.
40. Philip JG, Flower RJ, Buckingham JC. Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin-1. Reg Peptides 1998; 73: 133-139.
41. Yang Y, Hutchinson P, Morand EF. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. Arthritis Rheum 1999; 42: 1538-1544.
42. Movitz C, Dahlgren C. Quantification of annexin I in subcellular fractions of human neutrophils reveals an exclusive cytosolic localisation. Cell Biol Int 2001; 25: 963-969.
43. Castro-Caldas M, Duarte CB, Carvalho AP, Lopes MC. Dexamethasone induces the secretion of annexin I in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism. Mol Cell Biochem 2002; 237: 31-38.
44. Goulding NJ, Guyre PM. Regulation of inflammation by lipocortin 1. Immunol Today 1992; 13: 295-297.
45. Yang Y, Santos LL, Hutchinson P, Morand EF. Glucocorticoid inhibition of adjuvant arthritis synovial macrophage nitric oxide production: role of lipocortin 1. Clin Exp Immunol 1998; 111: 117-122.
46. Perretti M, Ahluwalia A, Harris JG, Goulding NJ. Lipocortin-1 fragments inhibit neutrophil accumulation and neutrophil-dependent oedema in the mouse: a qualitative comparision with an anti-CD11b monoclonal antibody. J Immunol 1993; 151: 4306-4314.
47. Perretti M, Ahluwalia A, Harris JG, Harris HJ, Wheller SK, Flower RJ. Acute inflammatory response in the mouse: exacerbation by immunoneutralization of li-

pocortin 1. Br J Pharmacol 1996; 117: 1145-1154.
48. Sudlow AW, Carey F, Forder R, Rothwell NJ. The role of lipocortin-1 in dexamethasone-induced suppression of PGE2 and TNFa release from human peripheral blood mononuclear cells. Br J Pharmacol 1996; 117: 1449-56.
49. Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. Br J Pharmacol 1997; 120: 1075-1082.
50. Tailor A, Flower RJ, Perretti M. Dexamethasone inhibits leukocyte emigration in rat mesenteric post-capillary venules: an intravital microscopy study. J Leuk Biol 1997; 62: 301-308.
51. Perretti M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. Gen Pharmacol 1998; 31: 545-552.
52. Charreau B, Coupel S, Goret F, Pourcel C, Soulillou JP. Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNFalpha-mediated endothelial cell activation. Transplantation 2000; 69: 945-953.
53. Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, et al. Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. Br J Pharmacol 1999; 126: 1307-1314.
54. Croxtall JD, Gilroy DW, Solito E, et al. Attenuation of glucocorticoid functions in an Anx -/- cell line. Biochem J 2003; 371: 927-935.
55. Parente L, Solito E. Annexin 1: More than an anti-phospholipase protein. Inflamm Res 2004;53:125--132.
56. Yang YH, Morand EF, Getting SJ, et al. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by annexin 1 in antigen-induced arthritis. Arthritis Rheum 2004; 50: 976-984.
57. Yang YH, Leech M, Hutchinson P, Holdworth SR, Morand EF. Anti-inflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. Inflammation 1997; 21: 583–596.
58. Podgorski MR, Goulding NJ, Hall ND, Flower RJ, Maddison PJ. Autoantibodies to lipocortin-1 are associated with impaired glucocorticoid responsiveness in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1992; 19: 1668--1671.
59. Goulding NJ, Dixey J, Morand EF, et al. Differential distribution of annexins-I, -II, -IV, and –VI in synovium. Ann Rheum Dis 1995; 54: 841-845.
60. Sampey AV, Hutchinson P, Morand EF. Annexin I surface binding sites and their regulation on human fibrobalst-like synoviocytes. Arthritis Rheum 2000; 43: 2537-2542.
61. Morand EF, Hutchinson P, Hargreaves A, Goulding NJ, Boyce NW, Holdsworth SR. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leucocyte subsets. Clin Immunol Immunopathol 1995; 76: 195-202.
62. Goulding NJ, Jefferiss CM, Pan L, Rigby WFC, Guyre PM. Specific binding of lipocortin-1 (annexin I) to monocytes and neutrophils is decreased in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1992; 35: 1395-1397.
63. Castro-Caldas M, Duarte CB, Carvalho AP, Lopes MC. 17β-Estradiol promotes the synthesis and the secretion of annexin 1 in the CCRF-CEM human cell line. Med Inflamm 2001; 10: 245-251.
64. Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. J Immunol 1997; 158: 446-451.
65. Da Silva JAP. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. Annas Rheum Diseases 1995; 54: 6-16.
66. D'Elia HF, Mattsson LA, Ohlsson C, et al. Hormone replacement therapy in rheumatoid arthritis is associated with lower serum levels of soluble IL-6 receptor and higher insulin-like growth factor 1.Arthritis Res Ther 2003; 5: R202-209.
67. Da Silva JA, Colville-Nash P, Spector TD, Scott DL, Willoughby DA. Inflammation-induced cartilage degradation in female rodents. Protective role of sex hormones. Arthritis Rheum 1993; 36: 1007-1013.
68. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. Clinical Science 1998; 94: 557-572.
69. Bijlsma JWJ, Saag KG, Buttgereit F, da Silva JAP. Developments in glucocorticoid therapy. Rheum Dis Clin N Am 2005; 31: 1-17.
70. Zhou J, Cidlowski AJ. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. Steroids 2005; 70: 407-417.
71. Tsitoura DC, Rothman PB. Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells. J Clin Invest 2004; 113: 619--627.
72. Wu CC, Croxtall JD, Perretti M, et al. Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 3473-3477.
73. Miele L, Cordella-Miele E, Facchiano A, Mukherjee AB. Novel anti-inflammatory peptides from the region of highest similarity between uteroglobin and lipocortin 1. Nature 1998; 335: 726-730.
74. Roviezzo F, Getting SJ, Paul-Clark MJ et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. J Physiol Pharmacol 2002; 53: 541-553.