



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

---

Caroline de Freitas Zanon

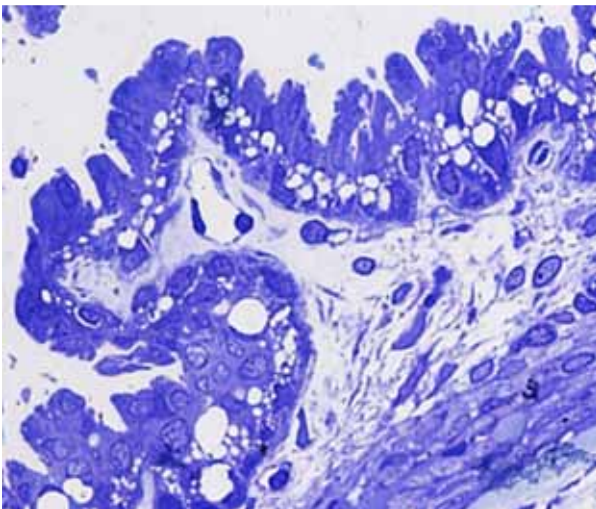
Efeito protetor da proteína anti-inflamatória Galectina-1 sobre o processo de uveíte induzida pelo inflamógeno lipopolissacarídeo

---

São José do Rio Preto  
2014

Caroline de Freitas Zanon

Efeito protetor da proteína anti-inflamatória Galectina-1 sobre o processo de uveíte induzida pelo inflamógeno lipopolissacarídeo



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração – Genética Humana e Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Oliani  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristiane Damas Gil

São José do Rio Preto  
2014

Zanon, Caroline de Freitas.

Efeito protetor da proteína anti-inflamatória Galectina-1 sobre o processo de uveíte induzida pelo inflamógeno lipopolissacarídeo / Caroline de Freitas Zanon. -- São José do Rio Preto, 2014  
105 f. : il.

Orientador: Sonia Maria Oliani

Coorientador: Cristiane Damas Gil

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Proteínas - Estrutura. 3. Galectina 1.  
4. Moléculas de adesão celular. 5. Leucócitos. 6. Uveíte. 7. Endotoxina.  
I. Oliani, Sonia Maria. II. Gil, Cristiane Damas. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.112

Caroline de Freitas Zanon

Efeito protetor da proteína anti-inflamatória Galectina-1 sobre o processo de uveíte induzida pelo inflamógeno lipopolissacarídeo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração – Genética Humana e Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Oliani  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith  
UNIFESP – São Paulo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Helena Poliselli Farsky  
USP – São Paulo

São José do Rio Preto  
24 de fevereiro de 2014

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Luis Henrique e Sandra, meus maiores exemplos de vida, por me ensinarem a ser uma pessoa de caráter e sempre me apoiarem em qualquer situação, fazendo de tudo para que eu atinja os meus objetivos.*

*À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, pela oportunidade e confiança concedidas,  
por quem tenho imenso respeito e admiração, exemplo de mestre e cientista.*

*Muito obrigada pelos ensinamentos e orientação.*

*À coorientadora, Profa. Dra. Cristiane Damas Gil, mais que professora, uma grande amiga que interagiu em todas as fases deste trabalho e me trouxe cada vez mais experiência e amadurecimento pelas imprescindíveis sugestões e contribuições.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por tudo que me concedeu até aqui, por me dar forças para não desistir nos obstáculos e lutar sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2012/02759-1) pelas bolsas de Mestrado concedidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ Universal, processo 476136/2011-3) pelo Auxílio Pesquisa concedido para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), por possibilitar a realização desse trabalho.

À amiga Nágila Maiara Dinardi, a qual vem acompanhando minha jornada desde o início, sempre presente e dedicada, dividindo comigo as alegrias e as tristezas, muito obrigada pela amizade.

À Ana Flávia Teixeira Rossi, pela paciência em me ajudar, sempre muito prestativa e atenciosa.

Aos valiosos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Alexandre Dantas Gimenes, Aline Camargo Miranda, Andréia Rodrigues de Moraes, Cristina Ribeiro Mendes, Claudia de Mello Bosnich, Gabriela Franco Bueno, Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, Janesly Prates, Jéssica Zani Lacerda, Kallyne Kioko Mimura, Lucas Ribeiro de Azevedo, Marina de Paula Silva, Maysa Succi, Marystela Fávero Oliveira, Rafaela Molás, uma equipe a qual é exemplo de trabalho com alegria e entusiasmo.



Às queridas Ana Paula Girol e Carla Patrícia Carlos, exemplos de integridade, profissionalismo e dedicação, pelo auxílio e ensinamentos prestados.

À minha irmã Camila de Freitas Zanon, que mesmo não sendo muito próximas, é uma pessoa muito importante pra mim, a qual eu quero ter sempre por perto.

Aos meus familiares e demais amigos, pelo apoio e incentivo, que de uma ou de outra maneira deram crédito ao meu trabalho.

“Tudo o que um sonho  
precisa para ser realizado  
é alguém que acredite  
que ele possa ser  
realizado!”

(Roberto Shinyashiki)

## RESUMO

**Introdução:** A inflamação é o principal fator contribuinte para inúmeras desordens oculares, podendo levar à cegueira e, em geral, são os glicocorticoides os medicamentos frequentemente administrados. No entanto, os efeitos adversos desses fármacos, limitam os seus usos. A proteína endógena galectina-1 (Gal-1) é capaz de controlar o processo de transmigração e apoptose dos leucócitos, contribuindo para a homeostase da reação inflamatória. No entanto, a expressão da Gal-1 em tecidos oculares normais e inflamados tem sido pouco estudada. **Objetivos:** Investigar a expressão e o mecanismo de ação da proteína endógena Gal-1 nos tecidos oculares de ratos na uveíte induzida por endotoxina (EIU) e o efeito anti-inflamatório da administração da galectina-1 recombinante (rGal-1). **Métodos:** Ratos machos (*Rattus norvegicus*) foram anestesiados e inoculados na pata direita com lipopolissacarídeo (LPS) (1mg/Kg) para o desenvolvimento da uveíte e, após, divididos nos seguintes grupos experimentais (n=12/grupo): EIU 24 e 48h; EIU 24h e tratamento intraperitoneal com rGal-1 (3µg/animal), 15 minutos após o LPS. O sangue foi coletado para detecção da porcentagem de leucócitos polimorfonucleares positivos para as moléculas de adesão L-selectina (CD62L) e  $\beta$ 2-integrina (CD11b), por citometria de fluxo. No humor aquoso (HA) foram quantificadas as células inflamatórias pela câmara de Neubauer. Os olhos, após enucleação, foram processados para análises histopatológicas, dosagens dos níveis das citocinas MCP-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por painéis Milliplex MAP e análises da expressão da Gal-1 endógena por imuno-histoquímica e *Western blotting*. **Resultados:** A EIU 24h provocou sinais esperados de inflamação, incluindo intenso recrutamento de neutrófilos (N $\phi$ s) nos tecidos oculares, HA e sangue, e liberação de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com rGal-1 atenuou os efeitos ocorridos na EIU por meio da inibição do infiltrado de N $\phi$ s nos tecidos oculares e HA, diminuição da porcentagem de células CD62L<sup>+</sup> e, ainda, supressão da produção de IL-1 $\beta$  e IL-6. As análises imuno-histoquímicas da proteína endógena Gal-1 nos tecidos oculares mostraram intensa expressão nas células epiteliais (córnea, íris, processos ciliares e epitélio pigmentado da retina) e nervosas, em condições

normais ou inflamação. As análises densitométricas dos tecidos oculares demonstram regulação positiva significativa da expressão da Gal-1 no segmento anterior dos olhos no grupo EIU 24h e diminuição após tratamento com rGal-1. Essa modulação da Gal-1, nos grupos EIU 24h, foi confirmada pelas análises de *Western blotting*. **Conclusão:** Em conjunto, nossos dados indicam que a Gal-1 está envolvida na fisiologia dos tecidos oculares nas condições normais e inflamatórias, sugerindo essa proteína como alvo potencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas nos processos de inflamação ocular.

**Palavras-chave:** galectina-1, moléculas de adesão, leucócitos, uveíte induzida por endotoxina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Inflammation is the main contributing factor for many eye disorders, and may lead to blindness and, in general, glucocorticoids are the drugs frequently administered. However, the side effects of these drugs limit their use. Endogenous protein galectin-1 (Gal-1) is able to control the process of apoptosis and transmigration of leukocytes, contributing to the homeostasis of inflammation. However, the expression of Gal-1 in normal and inflamed ocular tissues has been little studied. **Objectives:** Investigate, in vivo, the expression and mechanism of action of endogenous protein Gal-1 in ocular tissues of rats in endotoxin-induced uveitis (EIU), and anti-inflammatory effect of administration of recombinant galectin-1 (rGal-1). **Methods:** Male rats (*Rattus norvegicus*) were anesthetized and inoculated in the right footpad with lipopolysaccharide (LPS) (1mg/kg) for developing uveitis, and after it divided into the following experimental groups (n=12/group): EIU 24 and 48h; EIU for 24h and treated intraperitoneally with rGal-1 (3µg/animal), 15 minutes after LPS. Blood was collected for detecting the percentage of positive cells for the adhesion molecules L-selectin (CD62L) and  $\beta$ 2-integrin (CD11b) in polymorphonuclear leukocytes (PMNs), by flow cytometry. Inflammatory cells was quantified in aqueous humor (AqH) in the Neubauer chamber. After enucleation, the eyes were processed for histopathological analysis, dosage levels of MCP-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 cytokine by panels Milliplex MAP and analysis of the expression of endogenous Gal-1 by immunohistochemistry and Western blotting. **Results:** EIU 24h provoked expected signals of inflammation, including intense recruitment of neutrophils (N $\phi$ s) in ocular tissues, AqH and blood, and release of proinflammatory cytokines. Treatment with rGal-1 attenuated the effects occurring in the EIU by inhibiting the infiltration of N $\phi$ s in eye tissues and the AqH, percentage decreased of CD62L<sup>+</sup> cells and, also, suppressing the production of IL-1 $\beta$  and IL-6. The immunohistochemical analysis of endogenous protein Gal-1 in eye tissues showed intense expression in epithelial (cornea, iris, ciliary processes and retinal pigment epithelium) and nerve cells, in normal or inflammation

conditions. The densitometric analyzes of eye tissues showed significant upregulation of expression of Gal-1 in the anterior segment of the eye in EIU 24h and decreased expression after treatment with rGal-1. This modulation of Gal-1 in EIU 24h groups was confirmed by Western blotting analysis.

**Conclusion:** Gal-1 is involved in the physiology of eye tissues under normal and inflammatory conditions therefore our data indicate this protein as a potential target for the development of new therapeutic strategies in the process of ocular inflammation.

**Keywords:** galectin-1, adhesion molecules, leukocytes, endotoxin-induced uveitis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Desenho esquemático ilustrando a estrutura do olho.</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2. Subfamílias da galectina baseadas em sua organização estrutural.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3. Análises histológicas dos tecidos oculares.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 4. Análises histopatológicas do processo de uveíte (EIU).</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5. Análises quantitativas dos neutrófilos e das células fagocitárias mononucleares no humor aquoso (HA) e sangue.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 6. Porcentagem dos leucócitos do sangue imunomarcados para as moléculas de adesão L-selectina (CD62L) e <math>\beta</math>2-integrina (CD11b) por citometria de fluxo.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 7. Efeitos do tratamento com a proteína Gal-1 na liberação de quimiocina e citocinas no plasma.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 8. Efeitos do tratamento com a proteína Gal-1 na liberação de quimiocina e citocinas nos tecidos oculares após EIU.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 9. Expressão da proteína Gal-1 nos tecidos oculares da região anterior do olho.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 10. Expressão da Gal-1 no segmento posterior do olho.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11. Expressão da Gal-1 no sobrenadante dos tecidos oculares</b>	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**%:** porcentagem

**°C:** graus Celsius

**µg:** microgramas

**µL:** microlitros

**µm:** micrômetros

**ANOVA:** análise de variância

**Ac2-26:** peptídeo mimético derivado da região N-terminal da anexina-A1

**BSA:** albumina bovina

**CD11b:** β2-integrina

**CD62L:** L-selectina

**CEEAA:** Comissão de Ética em Experimentação Animal

**COX-2:** ciclo-oxigenase-2

**CRD:** domínio reconhecedor de carboidrato

**EIU:** *Endotoxin-induced uveitis* = Uveíte induzida por endotoxina

**FAMERP:** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

**g:** gramas

**Gal-1:** galectina-1

**h:** horas

**HA:** humor aquoso

**HGF:** fator de crescimento do hepatócito

**IBILCE:** Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

**ICAM-1:** molécula de adesão intercelular 1

**IL:** interleucina

**i.p.:** intraperitoneal

**KDa:** quilodalton

**Kg:** quilogramas

**LPS:** lipopolissacarídeo

**M:** molar

**MCP-1:** proteína quimiotática de monócitos 1

**mg:** miligrama

**mL:** mililitros



**mM:** milimolar

**mm<sup>2</sup>:** milímetros quadrados

**Mφs:** células fagocitárias mononucleares

**NF-κB:** fator nuclear kappa B

**nM:** nanomolar

**NO:** *nitric oxide* = óxido nítrico

**Nφs:** neutrófilos

**PAF:** fator ativador plaquetário

**PBS:** tampão fosfato de sódio

**PMNs:** polimorfonucleares

**PVDF:** difluoreto de polivinilideno

**rGal-1:** galectina-1 recombinante

**S.E.M:** *Standard error of mean* = Erro padrão da média

**SUN:** *Standardization of Uveitis Nomenclature*

**TLR-4:** receptor toll like 4

**TNF-α:** fator de necrose tumoral alfa

**u.a.:** unidades arbitrárias

**VCAM-1:** molécula de adesão celular vascular 1

## Sumário

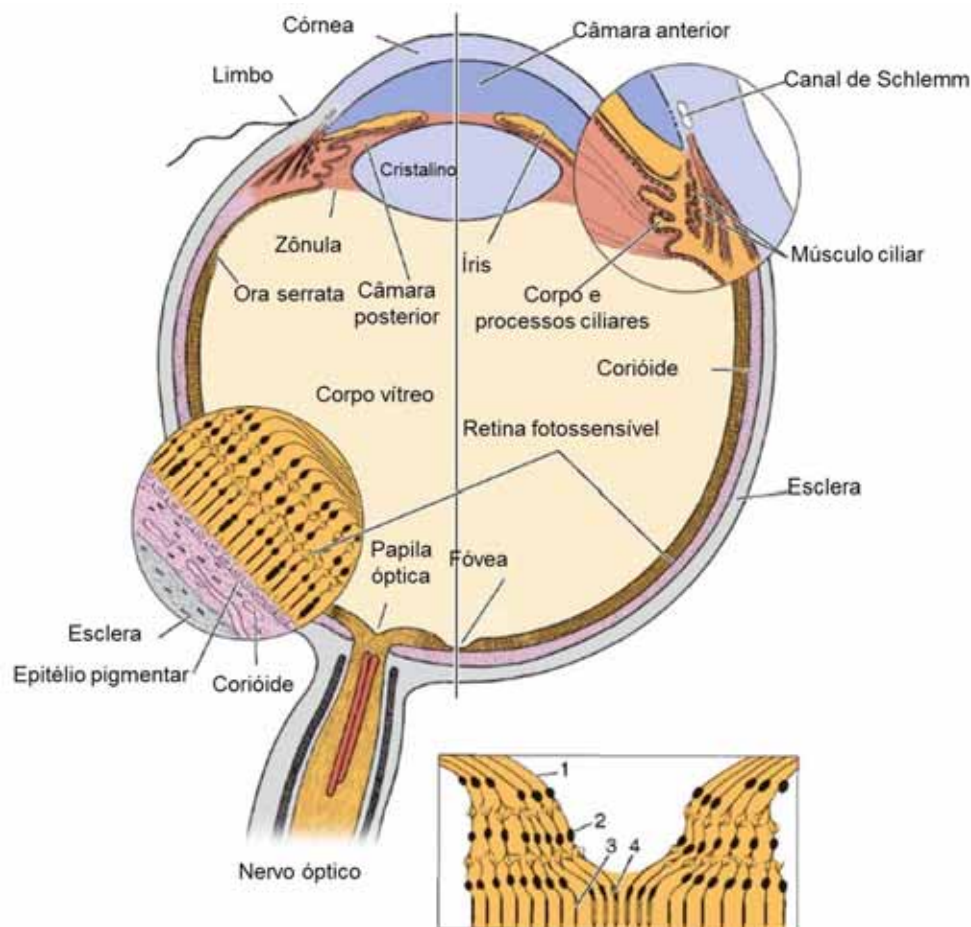
1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. Olho .....	19
1.2. Uveíte .....	20
1.3. Galectina-1 .....	23
2. OBJETIVOS .....	27
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos .....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Animais.....	30
3.2. Modelo experimental de uveíte e protocolo de tratamento .....	30
3.3. Análises histopatológicas .....	31
3.3.1 Fixação, processamento e inclusão para microscopia de luz.....	31
3.4. Análises quantitativas dos leucócitos no humor aquoso e sangue .....	32
3.5. Citometria de fluxo .....	32
3.6. Análises quantitativas dos níveis de citocinas.....	32
3.7. Análises imuno-histoquímicas.....	33
3.8. Western blotting .....	34
3.9. Análises estatísticas .....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Tratamento com a proteína anti-inflamatória Gal-1 inibe o influxo de neutrófilos nos tecidos oculares na EIU .....	37
4.2. Administração da Gal-1 reduz o número de neutrófilos e aumenta o de células fagocitárias mononucleares no humor aquoso (HA) e sangue .....	39
4.3. Gal-1 modifica as subpopulações de células positivas para as moléculas de adesão L-selectina e $\beta 2$ -integrina.....	41
4.4. Proteína anti-inflamatória Gal-1 reduz a liberação de mediadores inflamatórios no plasma e nos tecidos oculares de ratos submetidos à EIU.....	43
4.5. Gal-1 endógena modula a inflamação nos tecidos oculares.....	45
4.6. Quantificação da expressão endógena da proteína Gal-1 pela técnica de Western blotting .....	48
5. DISCUSSÃO .....	49
6. CONCLUSÕES .....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
APÊNDICE .....	66
ANEXO .....	103

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. Olho

O olho é um órgão fotossensível complexo que atingiu alto grau de evolução. Esse órgão é constituído por três túnicas dispostas concentricamente: a camada externa, formada pela esclera e córnea; a camada média ou túnica vascular, constituída pela corióide, corpo ciliar e íris; e a camada interna ou retina, que se comunica com o cérebro pelo nervo óptico. Apresenta, ainda, o cristalino ou lente, uma estrutura biconvexa transparente que é mantida em posição graças a um ligamento circular, a zônula ciliar, que se insere sobre um espessamento da camada média, o corpo ciliar. Em frente ao cristalino existe uma expansão pigmentada e opaca da camada média, que o recobre em parte, a íris. O olho possui três compartimentos: a câmara anterior, situada entre a íris e córnea; a câmara posterior, entre a íris e o cristalino; e o espaço vítreo, situado atrás do cristalino e circundado pela retina, composto por uma substância viscosa e gelatinosa, o corpo vítreo. Na câmara anterior e posterior existe um líquido que contém proteínas, o humor aquoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Uma representação esquemática da estrutura do olho e, em detalhes da retina, é mostrada na Figura 1.



**Figura 1. Desenho esquemático ilustrando a estrutura do olho.** Mostrando em detalhes a retina e o corpo ciliar. Na parte inferior observamos a fÓvea em maior aumento: 1, axÓnios

de células ganglionares; 2, células bipolares; 3, bastonetes; 4, cones. (Modificado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Este órgão é protegido por dois sistemas, uma barreira anatômica e outra imunológica, onde respostas inflamatórias são suprimidas (LAMBIASE et al., 2011; MOCHIZUKI; SUGITA; KAMOI, 2013). A presença da barreira hemato-ocular bloqueia anatomicamente a invasão de agentes patogênicos prejudiciais ao olho, a partir da circulação sanguínea periférica, protegendo as células e os tecidos relacionados à visão. Células epiteliais pigmentadas da íris e retina, células epiteliais não pigmentadas do corpo ciliar e células endoteliais vasculares da retina e córnea são componentes importantes dessa barreira hemato-ocular. Uma vez que a barreira é rompida, outro sistema de defesa, o sistema imune regional, suprime células T patogênicas e protege o olho. Por causa dessa característica única, o olho é considerado um órgão imunoprivilegiado, assim como o cérebro e os testículos (MOCHIZUKI; SUGITA; KAMOI, 2013). As células residentes na superfície interna da barreira hemato-ocular, podem suprimir a ativação de células T CD4<sup>+</sup> (FUTAGAMI et al., 2007; HORIE et al., 2009). Assim, o balanço entre células T CD4<sup>+</sup> ativadas no olho e células oculares residentes mantém a homeostase do olho.

## **1.2. Uveíte**

A uveíte é um processo inflamatório caracterizado pelo acúmulo de leucócitos na região da úvea, camada média, vascular e pigmentada do olho, composta anteriormente pela íris, intermediariamente pelo corpo ciliar e, posteriormente, pela corióide (DURRANI; MEAD; MURRAY, 2004; READ, 2006). O processo é doloroso e associado à fotofobia (WAKEFIELD; CHANG, 2005), sendo uma das condições oculares mais prejudiciais em humanos e uma das principais causas de cegueira no mundo (NUSSENBLATT, 1990; READ, 2006; AGRAWAL et al., 2010). Pode ser classificada como uveíte anterior, intermediária, posterior e panuveíte, dependendo do envolvimento anatômico do olho que é atingido. A uveíte anterior é, contudo, a forma mais comum, com diferentes incidências reportadas na literatura. Anatomicamente, a uveíte anterior envolve a inflamação somente na íris, na parte anterior do corpo ciliar, ou em ambas as estruturas. Além disso, a uveíte pode ser classificada de acordo com o tempo de duração e, seu curso, baseado no critério de Padronização da Nomenclatura da Uveíte (*Standardization of Uveitis Nomenclature-SUN*), sendo limitada (duração menor ou igual a três meses); persistente (duração maior que três meses); aguda (começo súbito e duração limitada); recorrente

(episódios repetidos separados por períodos de inatividade), e crônica (AGRAWAL et al., 2010).

A uveíte pode ser causada por processos infecciosos, autoimunes, tóxicos, malignos, ou traumáticos (READ, 2006; CHEN et al., 2009). Embora a inflamação desapareça em poucos dias, sua natureza recorrente pode resultar em outras complicações secundárias, como catarata, glaucoma, descolamento de retina e, por fim, destruição dos tecidos oculares e cegueira (POULAKI et al., 2007; YADAV, SUBRAMANYAM; RAMANA, 2009).

A uveíte induzida por endotoxina (EIU) é um modelo animal amplamente aceito para o estudo da inflamação ocular aguda (ROSENBAUM et al., 1980; BAO et al., 2008; CHANG et al., 2008; GIROL et al., 2013). Esse modelo serve como paradigma para a uveíte anterior humana (MCMENAMIN; CREWE, 1995; GUPTA et al., 2008), mas com algumas alterações no segmento posterior (vítreo e retina) (RUIZ-MORENO; THILLAYE; DE KOZAK, 1992; ALTAN-YAYCIOGLU et al., 2006).

O lipopolissacarídeo (LPS) representa uma toxina bacteriana exógena utilizada na indução da EIU, pois se liga a receptores *toll-like* 4 (TLR4) (CHANG; MCCLUSKEY; WAKEFIELD, 2006) e estimula a síntese e liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, como o óxido nítrico (NO) (GOUREAU et al., 1995; CHANG et al., 2008), fator ativador plaquetário (PAF), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) (LENNIKOV et al., 2012) e outras citocinas (CURNOW; MURRAY, 2006; MEDEIROS et al., 2008; LI et al., 2010). A cascata de ativação mais frequentemente envolvida, nesse modelo experimental, é a translocação do fator de transcrição  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) do citoplasma para o núcleo (MEDEIROS et al., 2008; KALARIYA et al., 2011).

Bactérias gram-negativas na circulação sanguínea podem provocar sepse metastática no olho (CHIU et al., 2007), condição que acomete aproximadamente 32-37% dos casos de endoftalmite endógena no ocidente e 70% nos países orientais (JACKSON et al., 2003). O LPS de bactérias gram-positivas e negativas, incluindo *S. aureus* e *E. coli*, pode induzir doenças na retina, como hemorragia retiniana (CELIK et al., 2006), enquanto a *Chlamydia pneumoniae* pode apresentar correlação com a progressão da degeneração macular relacionada com a idade (ROBMAN et al., 2005).

Na EIU, como em outros modelos, o LPS pode causar alterações na expressão de moléculas de adesão, tais como as L-selectina e integrinas

CD11/CD18 (RODRIGUES et al., 2007). O aumento na expressão desses mediadores inflamatórios contribui para o desenvolvimento da uveíte por meio da quebra da barreira hemato-ocular, o que leva a infiltração de células inflamatórias no humor aquoso e no extravasamento de proteínas (BECKER et al., 2000; DE KOZAK et al., 2007).

A uveíte experimental mimetiza muito dos eventos que ocorrem no início do processo inflamatório, como a transmigração dos neutrófilos na íris após duas e quatro horas da administração da endotoxina (BECKER et al., 2000). O processo inflamatório atinge o pico máximo em 24 horas após a injeção de LPS e, gradualmente, regride após 48 horas (YANG et al., 2003; HAFEZI-MOGHADAM et al., 2007). Além disso, YANG et al. (2003) visualizaram, *in vivo*, os processos de apoptose e necrose durante a EIU em camundongos, usando marcadores fluorescentes. Os autores observaram apoptose de algumas células infiltradas mesmo nos estágios iniciais do processo inflamatório, sugerindo que esse processo é um mecanismo importante na regressão da EIU.

Nos últimos anos tem ocorrido um avanço no entendimento dos mecanismos anti-inflamatórios que operam no organismo para suprimir a reação inflamatória, (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005; NORLING; PERRETTI, 2013). O organismo, seguido de um insulto inflamatório, constrói uma rápida e coordenada resposta: os leucócitos são ativados e transmigrados para o tecido circundante, em direção ao local da inflamação (BEUTLER, 2004; COOPER et al., 2012). As primeiras células que atravessam a barreira endotelial são os neutrófilos (COOPER et al., 2012). Nessa fase inicial da resposta inflamatória ocorre liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, tais como quimiocinas e moléculas de adesão (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999; GILROY et al., 2004). No entanto, devido à ação dos leucócitos extravasados ser altamente prejudicial ao organismo, é crucial que o processo inflamatório seja mantido sob controle e de maneira tempo-dependente (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005).

O tratamento farmacológico atual para uveíte inclui corticosteroides, agentes quimioterápicos e inibidores do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). No entanto, os efeitos adversos dessas drogas, como o aumento da pressão ocular ou citotoxicidade, limitam os seus usos (DUNN, 2004). Desse modo, os recentes avanços nos mecanismos da inflamação e nas descobertas de vários mediadores endógenos anti-inflamatórios, têm levado a uma nova linha de investigações sobre possibilidades terapêuticas para o tratamento da uveíte, em substituição das atuais.

(RODRIGUES et al., 2007; GUPTA et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008). Entre os mediadores anti-inflamatórios, a proteína galectina-1 (Gal-1) opera para regular o processo inflamatório (PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998; RABINOVICH et al., 1999; SANTUCCI et al., 2000; COOPER et al., 2010; COOPER et al., 2012).

### **1.3. Galectina-1**

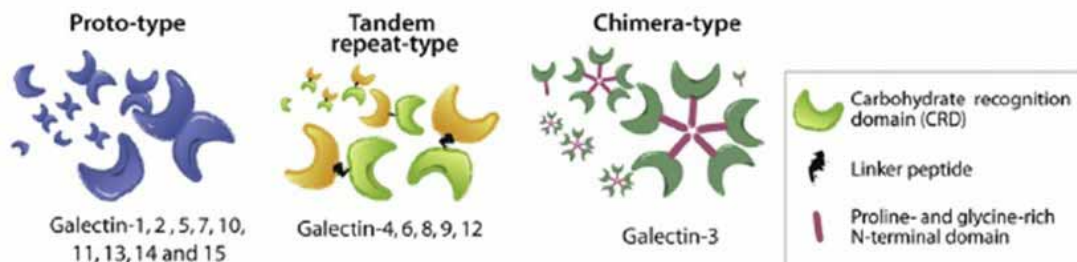
As galectinas pertencem a uma família de proteínas que foi preservada durante a evolução animal, observadas em mamíferos, aves, peixes, nematódeos e esponjas (LEFFLER et al., 2004). Essa família de proteínas é definida pela afinidade aos  $\beta$ -galactosídeos e apresentação de uma sequência conservada de 135 aminoácidos no domínio reconhecedor de carboidrato – CRD (LEFFLER et al., 2004). A maioria das galectinas são amplamente distribuídas, porém, as galectinas (Gal)-5, -10 e -12 têm uma distribuição tecido-específica (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Galectinas são expressas tanto intracelular (citosol, núcleo e membrana), quanto extracelularmente. No entanto, essas proteínas perderam a sequência de sinal requerida para a secreção convencional que poderia direcionar o transporte pelo caminho endoplasmático clássico entre retículo-Golgi (COOPER; BARONDES, 1999). Ao invés disso, algumas galectinas são secretadas por via secretora não clássica, similar à interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), anexina A1 (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009) e o fator de crescimento do fibroblasto (BURGESS; MACIAG, 1989). Após secretada no ambiente extracelular, as galectinas podem se ligar a receptores na superfície celular, permitindo a ativação das vias de sinalização envolvidas na modulação de vários processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, e secreção de citocinas (LIU; RABINOVICH, 2005). Além disso, outras funções têm sido atribuídas para as galectinas, que incluem: adesão celular, regulação do crescimento celular, embriogênese, metástase, splicing do pré-RNAm, imunomodulação e inflamação (RABINOVICH; RUBINSTEIN; FAINBOIM, 2002). Fortes evidências sugerem um papel mais específico das galectinas, como mediadores das fases de resolução da inflamação, em virtude da sua atividade pró-apoptótica em leucócitos ativados (PERILLO et al., 1995; HADARI et al., 2000; TSUCHIYAMA et al., 2000; CEDENO-LAURENT; DIMITROFF, 2012).

Em mamíferos, 15 membros dessa família foram descritos e clonados (LIU; RABINOVICH, 2010). Com base na organização estrutural, Hirabayashi; Kasai



(1993) classificaram as galectinas em três subfamílias: *prototípicas*, *quiméricas* e do tipo repetições em sequência (*tandem-repeats*). As *prototípicas* (Gal-1,2,5,7,10,11,13,14, e 15) são compostas por um único tipo de CRD (~15 kDa) e, podem se dimerizar formando homodímeros com dois CRDs idênticos (~30 kDa). A subfamília *quimérica* tem como único representante a Gal-3 (~30 kDa), e possui um CRD e um domínio aminoterminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina. A terceira subfamília, *tandem-repeats* (galectinas-4,6,8,9, e 12) apresentam dois CRDs distintos e homólogos (LIU; RABINOVICH, 2010). Uma apresentação esquemática da estrutura das subfamílias galectinas está reproduzida na **Figura 2**.



**Figura 2. Subfamílias da galectina baseadas em sua organização estrutural.** (Figura modificada de RABINOVICH; CROCI, *Immunity*, 2012).

A Gal-1, proteína com peso molecular de 14,5 kDa, é um dos membros melhor caracterizado dessa família, com um CRD idêntico que pode se agregar em homodímeros, modula a sinalização, proliferação, e sobrevivência celular, além de exercer um papel crucial no controle da inflamação aguda e crônica e na neovascularização. Suas funções são determinadas pela sua localização celular e concentração em diversos tecidos e tipos celulares, podendo controlar os processos celulares pela modulação de vias de sinalização intracelular ou extracelular, por meio de mecanismos que envolvem o reconhecimento e a ligação cruzada com N- e O-glicanos na superfície celular de proteínas glicoconjugadas (BARONDES et al., 1994; PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998; LIU; RABINOVICH, 2010; CEDENO-LAURENT; DIMITROFF, 2012; RABINOVICH; CROCI, 2012; SEROPIAN et al., 2013).

A Gal-1 intracelular é predominantemente monomérica e regula o crescimento celular via interação proteína-proteína com RAS citoplasmático (PAZ et al., 2001). A atividade de lectina da Gal-1, ao contrário, é baseada nas interações com  $\beta$ -galactosídeos predominantemente encontrados no compartimento extracelular (EARL; BI; BAUM, 2011). Em geral, as atividades/efeitos mediados pela Gal-1 podem ser divididos em dois contextos celulares: **a) relacionado às células T:** apoptoses e transporte de células (PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998; DIAS-

BARUFFI et al., 2003), imunorregulação (GARÍN et al., 2007; ILARREGUI et al., 2009) e evasão imune do câncer (RUBINSTEIN et al., 2004), e **b) não relacionado às células T**: adesão celular (WOYNAROWSKA et al., 1994), desenvolvimento das células B (GAUTHIER et al., 2002), *splicing* do mRNA (PATTERSON; WANG; WANG, 2004), angiogênese (THIJSEN et al., 2006), e diferenciação/homeostase de nervo e músculo (GOLDRING et al., 2002; GAUDET et al., 2005), entre outras (CEDENO-LAURENT; DIMITROFF, 2012).

A expressão da Gal-1 foi observada em várias células relacionadas com a resposta inflamatória, especialmente neutrófilos e mastócitos (GIL et al., 2006a; GIL et al., 2006b), macrófagos (RABINOVICH et al., 1998), linfócitos T e B (BLASER et al., 1998; ZUÑIGA et al., 2001) e células endoteliais (LA et al., 2003; GIL et al., 2006a; GIL et al., 2006b), sugerindo um importante papel na geração e manutenção da homeostasia do sistema imune. A expressão, secreção e distribuição celular dessa proteína são altamente susceptíveis à modulação por diferentes estímulos inflamatórios, como por exemplo, peptídeos quimiotáticos, lipopolissacarídeos (LPS), fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e carragenina (RABINOVICH et al., 2002; GIL et al., 2006a).

As propriedades anti-inflamatórias da Gal-1 foram avaliadas em vários modelos de inflamação crônica e autoimune, incluindo encefalomielite autoimune (OFFNER et al., 1990), artrite (RABINOVICH et al., 1999), uveíte (TOSCANO et al., 2006), hepatite (SANTUCCI et al., 2000) e diabetes (PERONE et al., 2006). Essa proteína participa da interação da superfície celular com a matriz-extracelular por meio de ligações a proteínas gliconjugadas (BARONDES et al., 1994), inibe o rolamento das células polimorfonucleares (PMNs) e o extravasamento para o local inflamado (COOPER et al., 2012). A inibição de neutrófilos extravasados pela adição de Gal-1 exógena foi demonstrada em uma série de condições *in vivo* e *in vitro*, como em modelos de peritonites aguda induzidas por IL-1 $\beta$  e zymosan, em edema de pata induzida por fosfolipase A<sub>2</sub> e carragenina (RABINOVICH et al., 2000; LA et al., 2003; GIL; GULLO; OLIANI, 2010; IQBAL et al., 2011) e, ainda, em modelo de infarto agudo do miocárdio (SEROPIAN et al., 2013). Esse efeito anti-migratório da Gal-1 parece estar associado com a modulação da expressão das moléculas de adesão L-selectina e  $\beta$ 2-integrina na superfície dos leucócitos (COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008; GIL; GULLO; OLIANI, 2010) e não às relacionadas ao endotélio como E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (NORLING et al., 2008). A expressão dessa proteína também foi estudada no nosso laboratório, em células endoteliais e

neutrófilos humanos, durante o processo de transmigração induzido por IL-8 (GIL et al., 2006b). Os resultados obtidos sugeriram que as pequenas quantidades de Gal-1 endógena, encontradas nos neutrófilos transmigrados, indicam um processo de secreção. Resultados semelhantes também foram observados na migração de neutrófilos *in vivo*, em modelo de peritonite em ratos (GIL et al., 2006a).

A Gal-1 foi observada no epitélio pigmentado da retina, na membrana limitante externa e camada plexiforme externa em retinas bovinas e ratos (UEHARA; OHBA; OZAWA, 2001) e, pode estar envolvida na adesão das camadas externas de fotorreceptores e plexiforme por meio da interação com glicoconjugados com resíduos de  $\beta$ -galactosídeos na matriz entre os fotorreceptores.

A presença da Gal-1 na matriz-extracelular de membranas epiretinais, na vitreoretinopatia proliferativa, foi demonstrada por Alge et al. (2006). Esses pesquisadores propuseram que a migração do epitélio pigmentado da retina, induzido pelo fator de crescimento do hepatócito (HGF), pode ser dependente, ao menos em parte, da Gal-1 e dos mecanismos galactosídeo-dependentes.

A ocorrência de anticorpos circulantes anti-Gal-1 no soro de pacientes com uveíte autoimune e infecciosa foi investigada por Romero et al. (2006). Esses pesquisadores mostraram a associação dos anticorpos anti-Gal-1 com a progressão da doença ocular. A administração sistêmica de Gal-1 recombinante (rGal-1), na uveíte autoimune experimental, foi investigada por Toscano et al. (2006), os quais concluíram que o tratamento com a rGal-1 resultou na redução da infiltração leucocitária e inibição da imunidade mediada por células T. O mecanismo direto para esses efeitos inibitórios da Gal-1, sobre o tráfico de neutrófilos, precisa ainda ser elucidado.

Diante dessas considerações, e da necessidade de novas terapias para o tratamento das inflamações oculares em substituição às atuais, como por exemplo, os corticosteroides que apresentam efeitos adversos (DUNN, 2004), investigamos, *in vivo*, o efeito do tratamento farmacológico com a rGal-1, bem como a expressão e localização da proteína anti-inflamatória Gal-1 endógena nos tecidos oculares após a ativação pelo inflamógeno LPS, usando um modelo de uveíte induzida por endotoxina.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. Objetivo Geral**

No presente estudo investigamos, *in vivo*, o efeito anti-inflamatório do tratamento com a Gal-1 recombinante humana (rGal-1) nos tecidos oculares após indução da EIU e a expressão e o mecanismo de ação da proteína endógena Gal-1 em ratos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Nas condições controle e após indução da EIU, com e sem tratamento com rGal-1, avaliamos o efeito anti-inflamatório e o mecanismo de ação da Gal-1 endógena, por meio de:

- análises quantitativas dos leucócitos nos tecidos oculares;
- análises quantitativas dos leucócitos e monócitos no sangue e humor aquoso; -
- expressão das moléculas de adesão L-selectina e  $\beta_2$ -integrina nos leucócitos do sangue por citometria de fluxo;
- dosagens das citocinas MCP-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nos tecidos oculares e no plasma por painéis Milliplex MAP;
- expressão e localização da Gal-1 endógena nos tecidos oculares, por meio da reação de imuno-histoquímica e *Western blotting*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

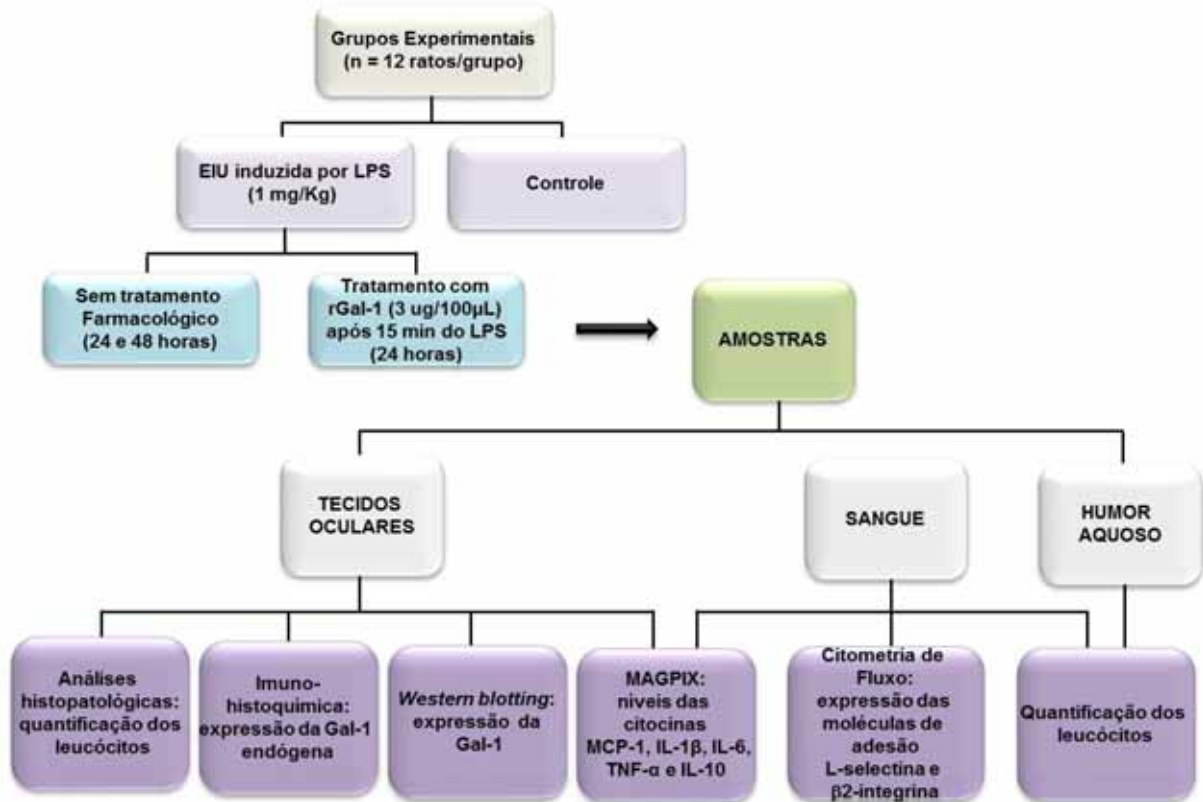
### **3.1. Animais**

Ratos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, foram obtidos no Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), com seis a oito semanas de vida e peso entre 150 a 200g. Os animais foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C), recebendo água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos sobre a utilização de animais elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do IBILCE (Processo 015/09 CEEA) (Anexo).

### **3.2. Modelo experimental de uveíte e protocolo de tratamento**

Os animais (n = 12/grupo) foram inoculados na pata direita com 1 mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS, tipo *Escherichia coli*, sorotipo 0127: B8, Sigma Chemical Co. Poole, Dorset, UK) diluído em 0,1 ml de solução salina tamponada (PBS), de acordo com os estudos realizados no nosso laboratório (DA SILVA; GIROL; OLIANI, 2011; GIROL et al., 2013). Os animais foram mantidos nessas condições por 24 e 48 horas e, então, sacrificados por dose excessiva dos anestésicos ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Animais sem manipulação foram usados como grupo controle. Para determinar o papel anti-inflamatório da proteína Gal-1, os ratos foram inoculados com LPS como descrito acima e, após 15 minutos, tratados intraperitonealmente com Gal-1 recombinante (rGal-1; Peprtech, EC td, London, UK), na concentração de 3µg/100µL por animal (GIL et al., 2006a) e, sacrificados após 24 horas.

O esquema a seguir mostra o protocolo experimental e o processamento das amostras.



### 3.3. Análises histopatológicas

#### 3.3.1 Fixação, processamento e inclusão para microscopia de luz

Os olhos direitos dos ratos controles e experimentais foram fixados em paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5% (solução 1:1), tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 24 horas, a 4°C e, então, seccionados ao meio. Uma parte dos fragmentos desses olhos (metades) foi desidratada em série crescente de etanol, diafanizada em xilol e incluída em resina LRGold (London Resin Co., Reading, Berkshire, UK) (OLIANI et al., 2001) para análises histopatológicas e, a outra parte incluída em parafina para as análises imuno-histoquímicas.

Nas análises histopatológicas dos olhos e quantitativas dos neutrófilos transmigrados nos tecidos oculares (n = 5/grupo) foram usadas secções de 1 µm do material incluído em LR Gold e coradas com Azul de Toluidina a 1% em solução de bórax 1% (TAAB Laboratories, UK). Os neutrófilos foram quantificados em três cortes semi-seriados, com distância de 30 µm entre cada secção e os valores obtidos expressos como média ± S.E.M. do número de neutrófilos por mm<sup>2</sup>. Essas análises foram realizadas no microscópio Axioskop2 Zeiss, do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP.



### **3.4. Análises quantitativas dos leucócitos no humor aquoso e sangue**

O humor aquoso (HA) foi coletado por punção da câmara anterior dos olhos direitos dos ratos (n = 5/grupo), sendo 10µL utilizados e corados em solução de Turk (90 µL). Os neutrófilos e as células fagocitárias mononucleares foram quantificados na câmara de Neubauer.

O sangue foi coletado por punção cardíaca e, amostras de 10 uL do sangue total (n = 7/grupo) foram diluídas na solução de Turk (190 uL), na proporção de 1:20, para quantificação dos neutrófilos e das células mononucleares em câmara de Neubauer. Os valores para quantificação dos leucócitos do HA e sangue foram demonstrados como média ± erro padrão (S.E.M.) do número de células x 10<sup>5</sup> por mL.

### **3.5. Citometria de fluxo**

Para a quantificação da expressão das moléculas de adesão L-selectina (CD62L) e β2-integrina (CD11b), nas diferentes condições experimentais, os leucócitos foram isolados do sangue total coletado em EDTA (100mg/mL) por punção cardíaca (n = 7/grupo). Aliquotas de sangue dos animais (10 µL) foram incubadas em 1µL dos anticorpos monoclonais *anti-rat* CD62L conjugado à PE e *anti-rat* CD11b conjugado à FITC (BD Pharmigen, San Diego, USA), diluídas em 8 uL de PBS (1:10), por 20 minutos, a 4°C no escuro. Imediatamente após a incubação, foram adicionados 180 µL da solução *Guava Lyse/Fixative* (Millipore), para lisar os eritrócitos e fixar as células por 20 minutos, a 37°C. Logo após, as células foram analisadas no citômetro de fluxo *Guava easyCyte* (Millipore). Os dados de 10.000 células foram obtidos e, somente leucócitos, morfolologicamente viáveis, foram considerados para as análises. Os leucócitos foram separados baseando-se no tamanho e granulosidade. A porcentagem (%) de células foi determinada.

### **3.6. Análises quantitativas dos níveis de citocinas**

As citocinas MCP-1, IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10 foram quantificadas no plasma e sobrenadante do macerado dos olhos inteiros dos ratos submetidos às diferentes condições experimentais descritas acima, utilizando o Kit *MILLIPLEX MAP* de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; *Millipore Corporation, EUA*) e analisadas no equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (*Millipore Corporation, EUA*).

Para as análises, um segundo experimento foi realizado e, os olhos intactos (esquerdos) de todos os grupos (n = 7/grupo) foram coletados e mantidos a -80°C até o momento do uso. Após, foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em eppendorfs, onde adicionamos 500 µL de uma solução de coquetel inibidor de proteases (*cOmplete Mini EDTA-free, Roche Applied Science, Mannheim, Germany*) e fosfatases (*PhosSTOP, Roche Applied Science, Mannheim, Germany*). Para o preparo dessa solução, uma pastilha do inibidor de proteases e outra do inibidor de fosfatases foram dissolvidas em 10 mL de tampão de lise. As *beads* magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados e homogeneizados conforme as instruções descritas no *RECYTMAG-65K Milliplex MAP Kit (Millipore)*. Inicialmente, foram adicionados 25 µL dos padrões, soluções controles e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada previamente com o tampão de lavagem. Em seguida, 25 µL de *assay buffer* foi adicionado às amostras, 25 µL do meio apropriado aos padrões e, 25 µL de *beads* magnéticas revestidas com anticorpos específicos em todos os poços (controles, padrões e amostras). Em seguida, a placa foi selada com adesivo próprio, revestida com papel alumínio e incubada por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação no *shaker*. Após, a placa foi lavada duas vezes com 200 µL de tampão de lavagem e incubada com 25 µL de anticorpo de detecção à temperatura ambiente, por uma hora, no *shaker*. Para completar a reação, 25 µL de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada e incubada por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. A placa foi então lavada duas vezes e incubada com 125 µL do fluido (*Drive Fluid*) por cinco minutos à temperatura ambiente, no *shaker*. Em seguida, a leitura da placa foi realizada no *LUMINEX xMAP MAGPIX*.

A concentração dos analitos foi determinada pelo *software MAGPIX xPONENT (Millipore Corporation, USA)*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) das concentrações de citocinas (pg/mL).

### **3.7. Análises imuno-histoquímicas**

A detecção da proteína Gal-1 nos tecidos oculares foi realizada em cortes de 4 µm dos olhos incluídos em parafina (n = 5/grupo). Esses foram preparados em lâminas com adesivo biológico (BIOBOND) (British Biocell International, Cardiff, UK). Após o processo de desparafinização em xilol e re-hidratação dos cortes histológicos em álcoois graduados (etanol absoluto a 85% e 50%), foi efetuada a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0, a 96°C, durante 20 minutos. As secções foram

lavadas com água destilada e, em seguida, realizada a inativação de peroxidases endógenas com metanol a 3% e peróxido de hidrogênio, durante 30 minutos. Após outra lavagem em tampão fosfato salina (PBS), por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada), foi realizada a incubação do material com o anticorpo policlonal *rabbit* anti-Gal-1 (Zymed Laboratories, Cambridge, UK), na diluição 1:200 em soroalbumina bovina a 1% (BSA), *overnight*, a 4°C, em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS por 15 minutos e incubados com o anticorpo secundário biotilado (KIT Histostain-SP – invitrogen), por 30 minutos. Após, foram lavados novamente em PBS e tratados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (invitrogen), por 30 minutos em câmara úmida, e revelados com o kit do substrato a base de 3,3'-diaminobenzidina (DAB - invitrogen), por 2 minutos, a 37°C, no escuro. Finalizada essa reação, as lâminas foram lavadas em água destilada, contracoradas com Hematoxilina de Harris e montadas com BIOMOUNT (British Biocell International, Cardiff, UK). O controle negativo da reação foi obtido omitindo-se o anticorpo primário.

As análises densitométricas da expressão da proteína Gal-1 foram realizadas nos tecidos oculares por meio de fotomicrografias (3/grupo experimental) obtidas no microscópio Axioskop2 Zeiss, com objetiva de 40X, e analisadas pelo *software* Axiovision. Para obtenção das médias relacionadas com a expressão da proteína, em cada fotomicrografia, 20 pontos imunorreativos para Gal-1 foram marcados na região do epitélio da córnea, dos processos ciliares, na camada plexiforme interna da retina. Ainda, 10 pontos foram marcados na íris e nas células ganglionares e plexiforme externa da retina. A quantificação da proteína foi realizada por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255).

### **3.8. Western blotting**

A expressão da proteína Gal-1 foi analisada no sobrenadante obtido de todos os grupos estudados de rato (n = 5/grupo), por meio da maceração dos olhos intactos (esquerdos), de acordo com o protocolo utilizado para a análise das citocinas, descrito anteriormente. Os anticorpos utilizados foram o monoclonal *mouse* anti- $\beta$ -actina (AC-15, A1978, *Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*) diluído 1:5000 e o policlonal *rabbit* anti-Gal-1 (Invitrogen), na concentração de 0,0025 $\mu$ g/ $\mu$ L. A concentração de proteína presente no sobrenadante foi medida utilizando o kit de ensaio de proteínas detergente compatível *BCA™ Protein Assay Kit (Pierce*

*Biotechnology, Rockford, IL, USA*). Todas as amostras de proteínas foram estocadas em alíquotas à  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

Quantidades iguais das amostras de proteína (31,5  $\mu\text{g}$ ) e o marcador de peso molecular (SM0671, *Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada*) foram separados por eletroforese em SDS-PAGE (12% *resolving gel* com 5% de *stacking gel*) à 130V, por uma hora (*Mini-Protean 3 Cell Electrophoresis System, BioRad, Hercules, CA, USA*), em condições de desnaturação.

As proteínas foram transferidas (325 mA por 70 minutos) para membranas de difluoreto de polivinilideno/PVDF (*Immobilon-P, Millipore Corp., Billerica, MA, USA*) utilizando tampão de transferência (25 mM Tris, 0,2 M glicina, 20% v/v metanol) e o *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad)*. As membranas foram submetidas à coloração cromogênica utilizando o Kit *Western Breeze Immunodetection (Ivitrogen)*, de acordo com as instruções do fabricante. Os *blots* foram analisados com o software *ImageJ* versão 1.440 (*NIH, Bethesda, MD*).

### **3.9. Análises estatísticas**

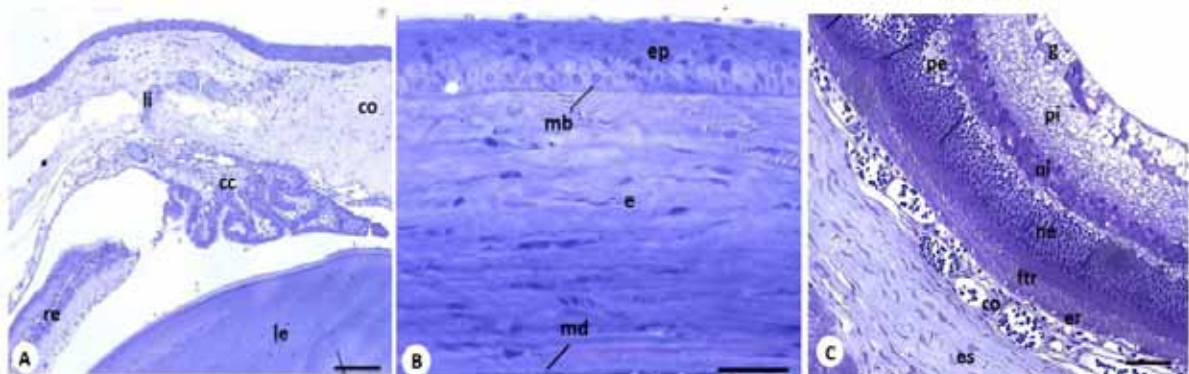
Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as amostras com distribuição normal, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni, ou análise t test para amostras não pareadas. O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, foi utilizado para amostras com distribuição não normal. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## **4. RESULTADOS**

---

#### 4.1. Tratamento com a proteína anti-inflamatória Gal-1 inibe o influxo de neutrófilos nos tecidos oculares na EIU

Histologicamente os olhos dos ratos apresentam no segmento anterior à córnea, a região de limbo, o corpo ciliar, a íris, estrutura rica em vasos sanguíneos e, após, a lente (Figura 3A). Ainda, entre a córnea e íris observamos a câmara anterior e, entre a íris e lente a câmara posterior, ambas preenchidas pelo humor aquoso. Na junção corneoescleral ou limbo, local rico em vasos sanguíneos, localizamos a rede trabecular e o seio venoso da esclera (canal de Schlemm). Na córnea, estrutura transparente e avascular, distinguimos as cinco regiões típicas: endotélio, membrana de Descemet, estroma, membrana de Bowman e epitélio anterior (Figura 3B). No segmento posterior do olho (Figura 3C), observamos as três túnicas dispostas concentricamente: a camada externa, a esclera, formada por tecido conjuntivo denso e delgado; a média, altamente vascularizada, constituída pela corióide e, a interna, a retina. Nessa, observamos as camadas que a constituem: epitélio pigmentado da retina, segmento externo dos fotorreceptores, lâmina limitante externa, camada nuclear externa, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna, camada de células ganglionares, camada de fibras no nervo óptico e lâmina limitante interna.

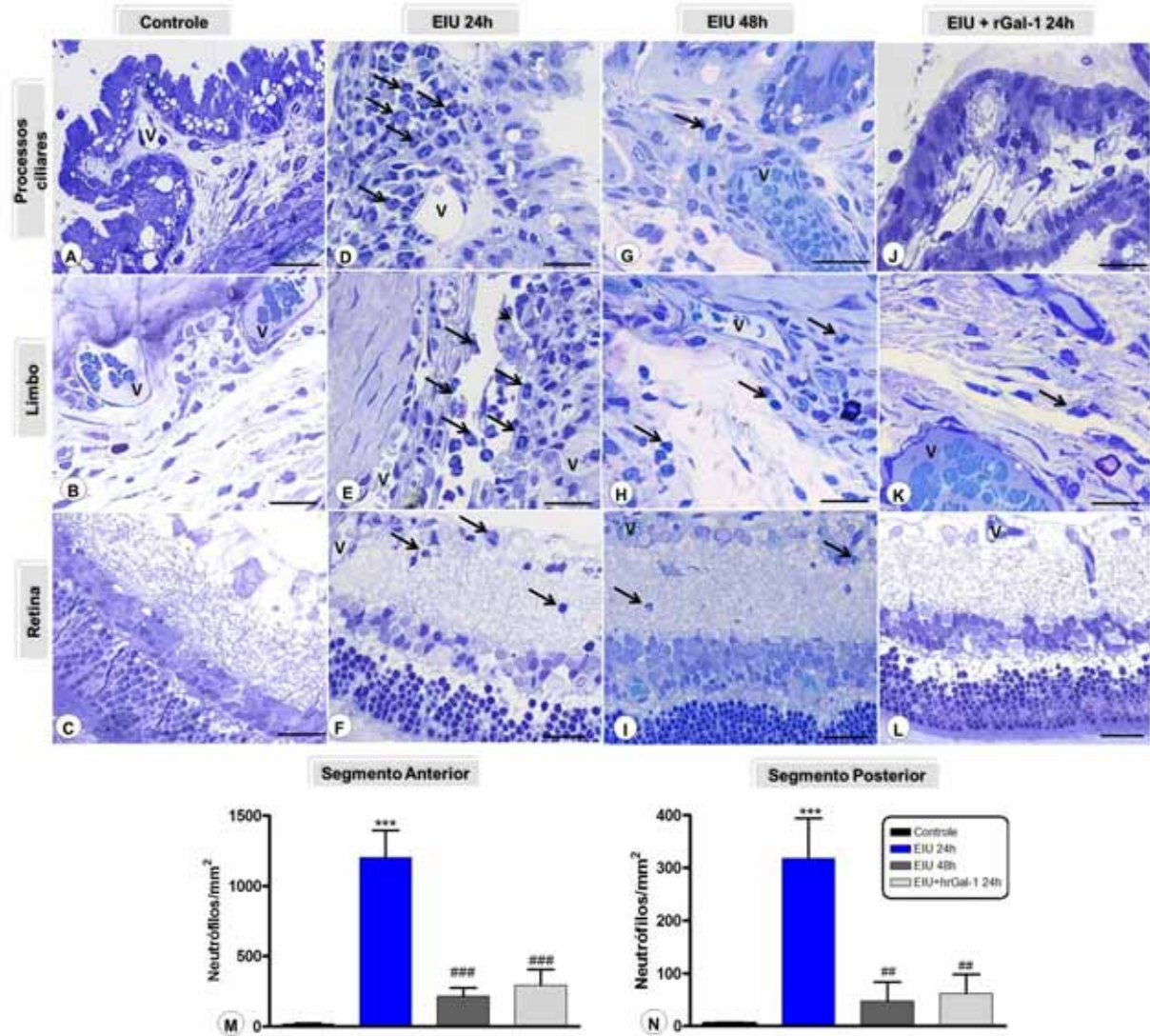


**Figura 3. Análises histológicas dos tecidos oculares. [A]** Visão panorâmica do segmento anterior do olho. Córnea (co), limbo (li), corpo ciliar (cc), retina (re) e lente (le). **[B]** Detalhe da córnea: endotélio (en), membrana de Descemet (md), estroma (e), membrana de Bowman (mb) e epitélio (ep). **[C]** Segmento posterior do olho. Esclera (es), corióide (co) e retina constituída pelas seguintes camadas: epitélio pigmentar da retina (er), segmento externo dos fotorreceptores (ftr), camada nuclear externa (ne), camada plexiforme externa (pe), camada nuclear interna (ni), camada plexiforme interna (pi) e camada de células ganglionares (g). Cortes de 1  $\mu$ m. Coloração: Azul de Toluidina. Barras: (A, C) 50 $\mu$ m; (B) 20  $\mu$ m.

Nos olhos dos animais controles e induzidos ao processo inflamatório com LPS por 24 (EIU 24h) e 48 horas (EIU 48h) analisamos os leucócitos. Outros animais foram induzidos a uveíte e tratados intraperitonealmente com rGal-1, sendo sacrificados após 24 horas (EIU+rGal-1 24h).

Nos olhos controles observamos ausência de leucócitos transmigrados nos segmentos anterior e posterior (Figuras 4A-C). Diferentemente, na EIU 24h ocorreu intenso influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, no segmento anterior do olho (Figuras 4D e E). Essas células foram observadas nas câmaras anterior e posterior e, também, no estroma da íris, corpo ciliar e processos ciliares. No tempo mais tardio da inflamação, EIU 48h, ocorreu diminuição do influxo dessas células nos tecidos oculares (Figuras 4G e H). O tratamento com a rGal-1 (EIU+rGal-1 24h) foi efetivo na diminuição dessas células inflamatórias (Figuras 4J e K). As análises quantitativas do segmento anterior dos olhos, do grupo EIU 24h, mostraram aumento significativo dos neutrófilos no tecido ocular, sobretudo na região do limbo e processos ciliares, em relação aos controles (Figura 4M). A diminuição no número de células transmigradas após tratamento farmacológico com rGal-1 foi semelhante àquela observada na EIU 48h, considerada fase de remissão do processo inflamatório (Figura 4M). Esses resultados mostraram reduções significantes dos neutrófilos extravasados nos tecidos oculares comparadas à EIU 24h (Figura 4M).

Embora o processo inflamatório induzido pelo LPS, após 24 horas, tenha sido mais evidente no segmento anterior do olho, foi possível observar alterações no segmento posterior. Os neutrófilos foram observados transmigrados no humor vítreo e na retina, principalmente na camada plexiforme interna (Figura 4F). O número de neutrófilos diminuiu nos grupos EIU 48h não tratado (Figura 4I) e EIU+rGal-1 24h (Figura 4L), em relação ao grupo EIU 24h. Nesse segmento observamos diferenças significantes no número de neutrófilos entre os quatro grupos experimentais, com aumento na EIU 24h em relação ao controle e diminuição na EIU 48h e EIU+rGal-1 24h, em relação ao grupo EIU 24h (Figura 4N).



**Figura 4. Análises histopatológicas do processo de uveíte (EIU).** Grupos [A-C] Controle. Processos ciliares, limbo e retina. [D-F] EIU 24h. Influxo de neutrófilos extravasados (setas). [G-I] EIU 48h e [J-L] tratado com rGal-1 (EIU+rGal-1 24h). Redução do número de neutrófilos nos segmentos anterior e posterior. Vasos sanguíneos (V). Cortes de 1 µm. Coloração: Azul de Toluidina. Barras: 20 µm. **Análise quantitativa dos neutrófilos nos segmentos [M] anterior e [N] posterior do olho.** Os resultados representam a média ± S.E.M. do número de células por mm<sup>2</sup> (n=5 animais por grupo). \*\*\* p<0,001 versus grupo controle; ## p<0,01 ### p<0,001; versus grupo EIU 24h.

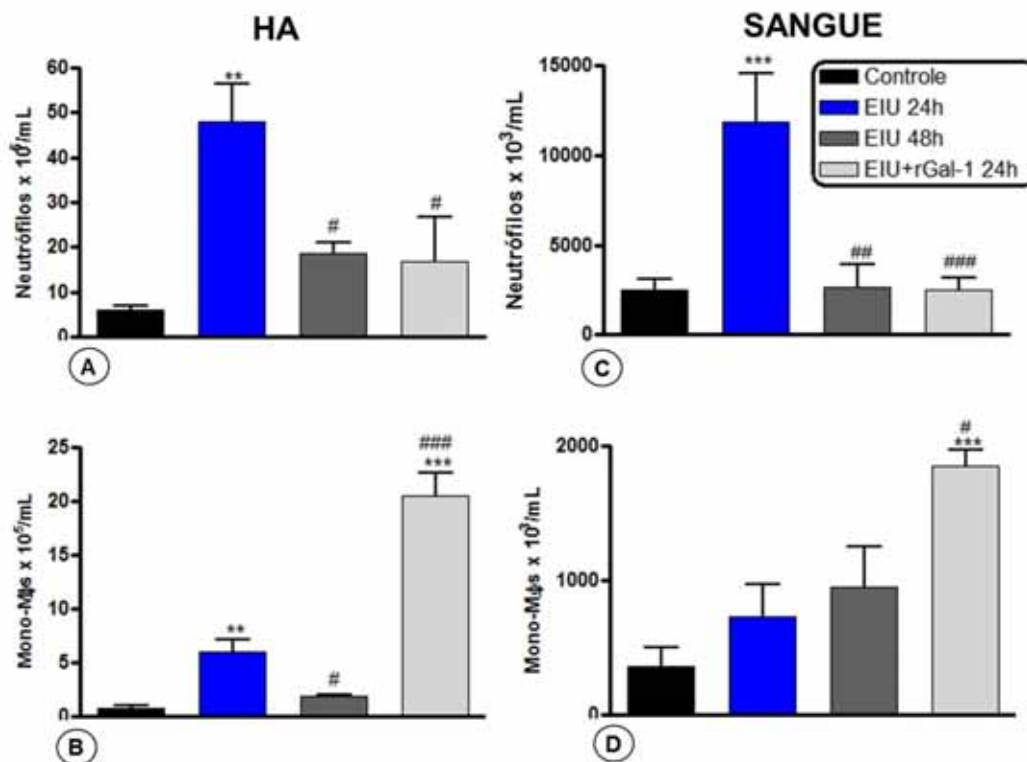
#### 4.2. Administração da Gal-1 reduz o número de neutrófilos e aumenta o de células fagocitárias mononucleares no humor aquoso (HA) e sangue

Na EIU 24h ocorreu intensa resposta inflamatória caracterizada pelo aumento significativo no número de neutrófilos no HA (Figura 5A) e sangue (Figura 5C), em



relação ao grupo controle. No tempo mais tardio da inflamação (EIU 48h) diminuiu significativamente o número de neutrófilos no HA (Figura 5A) e sangue (Figura 5C), comparada ao grupo EIU 24h.

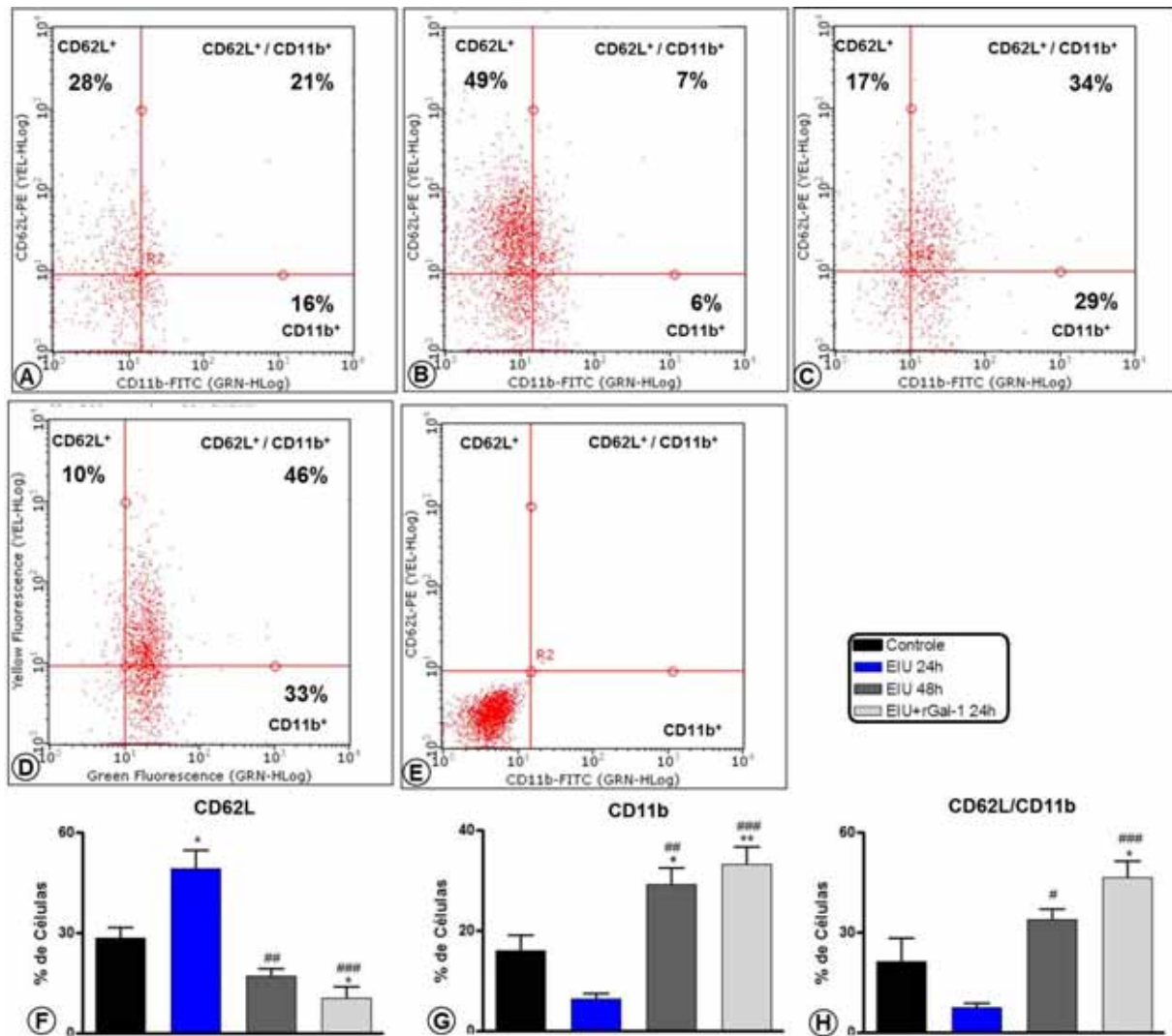
O efeito do tratamento farmacológico com a rGal-1 sobre a migração das células inflamatórias também foi avaliado, mostrando que no grupo EIU+rGal-1 24h ocorreu significativa diminuição no número de neutrófilos no HA (Figura 5A) e sangue (Figura 5C) em relação ao grupo EIU 24h sem tratamento. Enquanto, a quantificação das células fagocitárias mononucleares (Mono-M $\phi$ s) mostrou aumento exacerbado após tratamento com rGal-1 no HA (Figura 5B) e sangue (Figura 5D) em relação aos grupos EIU 24h sem tratamento e controle, exacerbando o efeito anti-inflamatório da proteína nesse modelo experimental.



**Figura 5. Análises quantitativas dos neutrófilos e das células fagocitárias mononucleares no humor aquoso (HA) e sangue.** Os resultados foram expressos em número de células x10<sup>5</sup>/mL (n=5) no HA [A e B] e, número de células x10<sup>3</sup>/mL (n=7) no sangue [C e D], dos animais controle, induzidos à uveíte pelo LPS (EIU 24 e 48h) e EIU+rGal-1 24h. [A] e [C] Neutrófilos, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 versus grupo controle; # p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 versus grupo EIU 24h. [B] e [D] Células fagocitárias mononucleares (Mono-M $\phi$ s), \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 versus grupo controle; # p<0,05; ###p<0,001 versus grupo EIU 24h.

#### **4.3. Gal-1 modifica as subpopulações de células positivas para as moléculas de adesão L-selectina e $\beta$ 2-integrina**

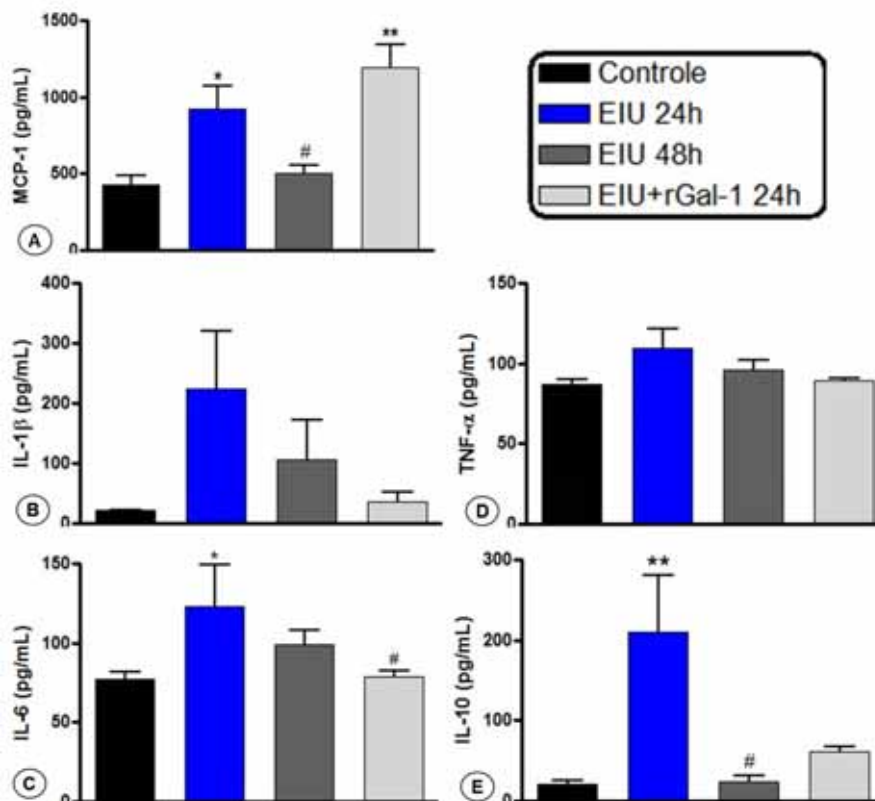
A expressão das moléculas de adesão nos leucócitos do sangue periférico foi investigada nas diferentes condições experimentais, por meio da citometria de fluxo. Inicialmente, as análises dos gráficos *dot plots* demonstraram, na EIU 24h, alta incidência de leucócitos imunomarcados somente para CD62L<sup>+</sup> (Figura 6B), quando comparamos com os grupos controle (Figura 6A), EIU 48h (Figura 6C) e EIU+rGal-1 24h (Figura 6D). No entanto, nos grupos EIU 48h e tratado com rGal-1 observamos alta incidência de células CD11b<sup>+</sup> e duplamente imunomarcadas CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (Figuras 6C e D). A análise das porcentagens de células CD62L<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> confirmaram essas observações (Figura 6F-H). EIU 24h foi associada ao aumento significativo de leucócitos CD62L<sup>+</sup> em relação ao grupo controle (Figura 6F), enquanto o tratamento farmacológico com rGal-1 reduziu a porcentagem das células CD62L<sup>+</sup> e, aumentou significativamente os leucócitos CD11b<sup>+</sup> (Figura 6G) e CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (Figura 6H). Dados semelhantes ao grupo EIU+rGal-1 24h foram observados para o grupo EIU 48h. Células sem marcação estão representadas na Figura 6E.



**Figura 6. Porcentagem dos leucócitos do sangue imunomarcados para as moléculas de adesão L-selectina (CD62L) e  $\beta$ 2-integrina (CD11b) por citometria de fluxo. [A-D] Dot plots representativos das células CD62L<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> nos grupos controle [A], induzidos à EIU 24h [B] e 48h [C], e tratados com rGal-1 após EIU 24h [D]. [E] Células sem marcação (controle negativo da reação). [F-H] Porcentagem de leucócitos CD62L<sup>+</sup> [F], CD11b<sup>+</sup> [G] e CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> [H] nos diferentes grupos experimentais (n=5 animais por grupo). Os dados representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de células. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01 versus controle; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 versus EIU 24h.**

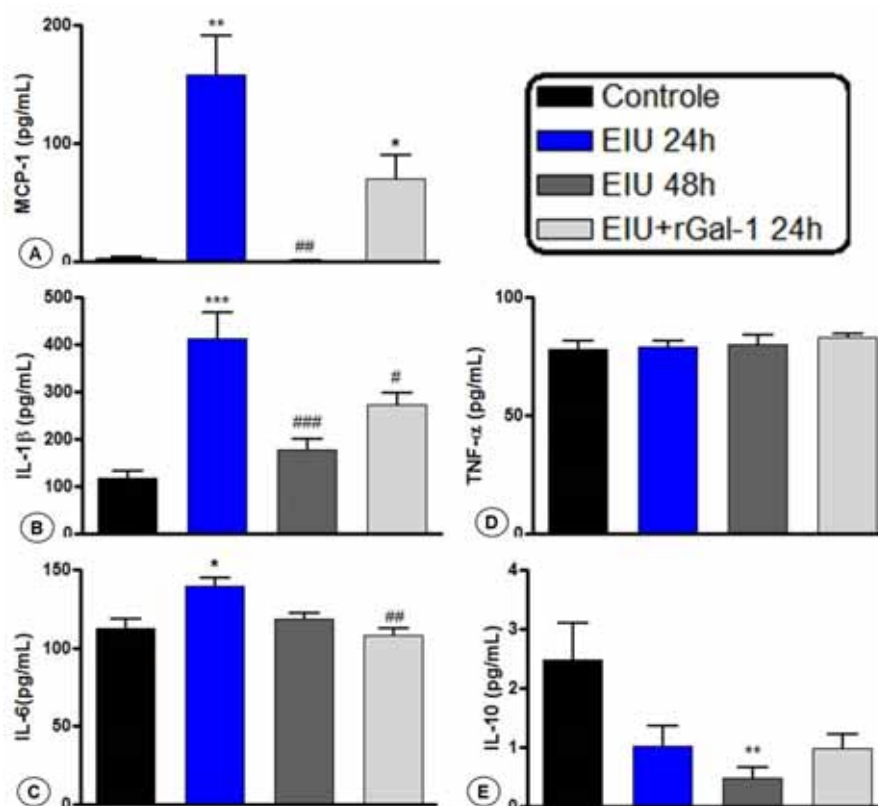
#### 4.4. Proteína anti-inflamatória Gal-1 reduz a liberação de mediadores inflamatórios no plasma e nos tecidos oculares de ratos submetidos à EIU

No plasma dos animais na EIU 24h observamos aumento significativo da quimiocina MCP-1 (Figura 7A) e das citocinas pró-inflamatória IL-6 e anti-inflamatória IL-10, em relação ao controle (Figuras 7C e E, respectivamente). Após, na EIU 48h, foram detectados diminuição significativa dos níveis de MCP-1 e IL-10 (Figuras 7A e E) em relação ao grupo EIU 24h. Enquanto, o tratamento com rGal-1 foi eficiente na diminuição da IL-6 (Figura 7C). No entanto, ressaltamos que os animais tratados apresentaram aumento significativo de MCP-1 em relação ao controle (Figura 7A), e não houve diferenças significantes entre os grupos para os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Figuras 7B e D).



**Figura 7. Efeitos do tratamento com a proteína Gal-1 na liberação de quimiocina e citocinas no plasma. MCP-1 [A], IL-1 $\beta$  [B], IL-6 [C], TNF- $\alpha$  [D] e IL-10 [E].** Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de pg de citocinas/mL no plasma de ratos controles, induzidos à uveíte (EIU 24h e EIU 48h) e tratados (EIU+rGal-1 24h) (n = 5 animais/grupo). \*p<0,05; \*\*p<0,01 versus controle, #p<0,05 versus EIU 24h.

Nos tecidos oculares, a EIU 24h provocou aumento significativo da quimiocina MCP-1 (Figura 8A) e das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e IL-6 (Figuras 8B e C) em relação aos controles. Após 48h da EIU, os níveis de MCP-1 e IL-1 $\beta$  reduziram significativamente em relação ao grupo EIU 24h (Figuras 8A e B), e de IL-10 em relação ao controle (Figura 8E). O tratamento com rGal-1, após 24h, apresentou diminuição significativa de IL-1 $\beta$  e IL-6, comparado ao grupo EIU 24h (Figuras 8B e C). Ainda, a administração da rGal-1 induziu aumento significativo da quimiocina MCP-1 em relação ao controle (Figura 8A). Não houve diferenças significantes entre os grupos nos níveis da citocina TNF- $\alpha$  (Figura 8D).



**Figura 8. Efeitos do tratamento com a proteína Gal-1 na liberação de quimiocina e citocinas nos tecidos oculares após EIU. MCP-1 [A], IL-1 $\beta$  [B], IL-6 [C], TNF- $\alpha$  [D] e IL-10 [E].** Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de pg de citocinas/mL nos tecidos oculares de ratos controles, induzidos à uveíte (EIU 24h e EIU 48h) e tratados (EIU+rGal-1 24h) (n = 5 animais/grupo). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  versus controle, #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  versus EIU 24h.

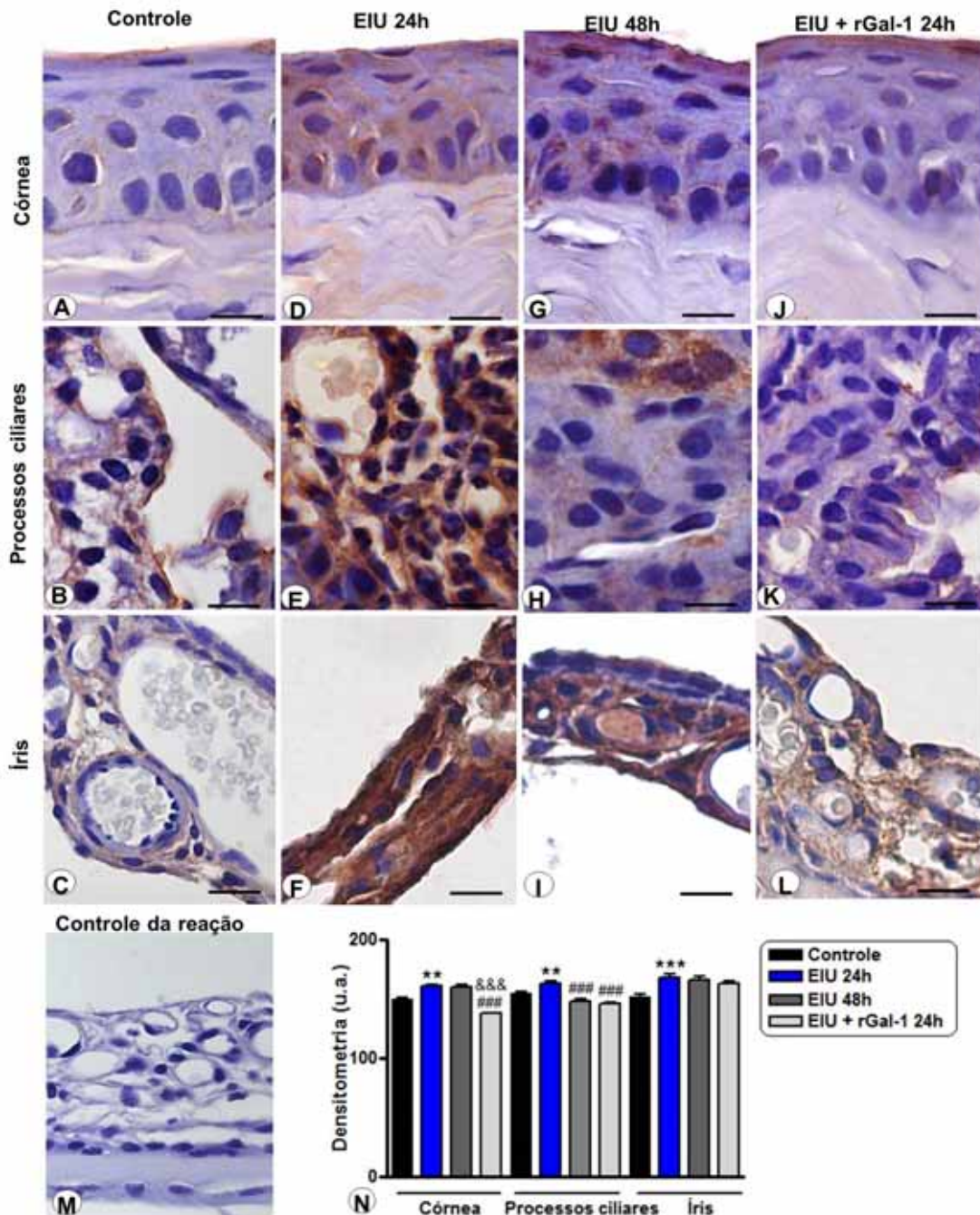
#### **4.5. Gal-1 endógena modula a inflamação nos tecidos oculares**

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas para definir a localização da expressão da Gal-1 no tecido ocular, nos grupos controle, EIU 24h, EIU 48h e EIU 24h tratado com rGal-1. Para análise da imunolocalização dessa proteína utilizamos o anticorpo policlonal *rabbit* anti-Gal-1.

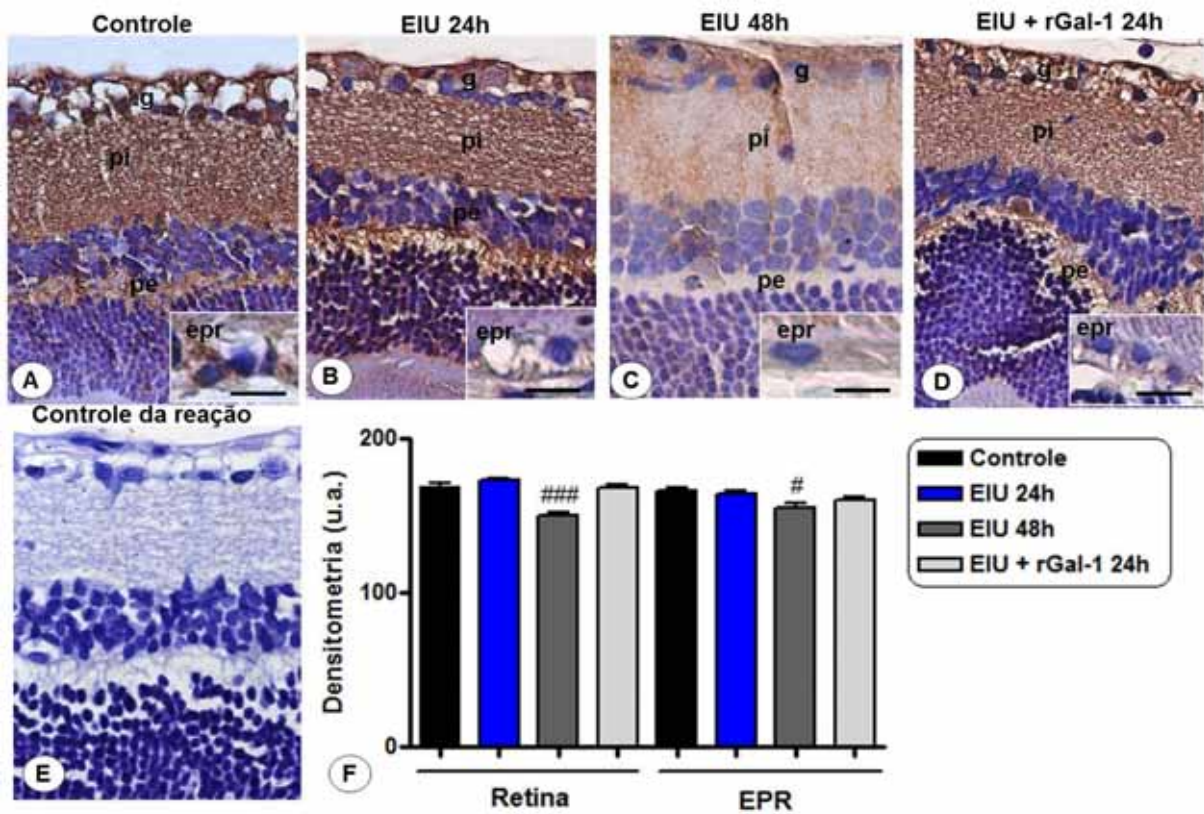
No segmento anterior, as células epiteliais da córnea, conjuntiva, processos ciliares e íris apresentaram imunorreatividade para a proteína Gal-1 nos grupos controle (Figuras 9 A-C) e ativados pelo LPS, tratados ou não com rGal-1 (Figuras 9 D-L). Os neutrófilos e as células endoteliais também foram imunorreativos.

A análise densitométrica, na EIU 24h, mostrou aumento significativo no segmento anterior, em relação ao controle (Figura 9N). Enquanto, no grupo EIU+rGal-1 24h ocorreu diminuição significativa na expressão da Gal-1 na córnea e processos ciliares em relação ao grupo EIU 24h. No grupo EIU 48h observamos menor intensidade na expressão de Gal-1 nessas regiões, embora significativa apenas nos processos ciliares em relação ao grupo EIU 24h (Figura 9N).

No segmento posterior, as camadas da retina apresentaram imunomarcção para a Gal-1, principalmente no epitélio pigmentado da retina (EPR), plexiformes externa e interna e, células ganglionares em todos os grupos estudados (Figuras 10A-D). Apenas o grupo EIU 48h apresentou menor imunorreatividade para Gal-1 nessa região em relação aos demais grupos experimentais (Figura 10C). Nenhuma imunomarcção foi detectada nos tecidos oculares utilizados como controles das reações (Figura 10E). A densitometria mostrou, nessas camadas da retina, imunomarcção semelhante para Gal-1 entre os grupos controle, EIU 24h e EIU+rGal-1 24h, indicando essa proteína como constitutiva nessa região, e com diminuição significativa no grupo EIU 48h (Figura 10F).



**Figura 9. Expressão da proteína Gal-1 nos tecidos oculares da região anterior do olho.** Grupos [A-C] Controle. Baixa imunorreatividade comparada ao grupo EIU 24h [D-F]. [J e K] EIU+rGal-1 24h. Mostrando diminuição da expressão da Gal-1 endógena em relação ao grupo EIU 24h. Controle da reação [M]. Cortes: 4 $\mu$ m. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 10 $\mu$ m. [N] **Análise densitométrica da expressão de Gal-1 nos tecidos oculares.** Os resultados (unidades arbitrárias - u.a.) foram obtidos como média  $\pm$  S.E.M. das dez fotomicrografias analisadas por tecido/grupo experimental. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  versus grupo controle; ###  $p < 0,001$  versus grupo EIU 24 horas; &&&  $p < 0,001$  versus EIU 48h.

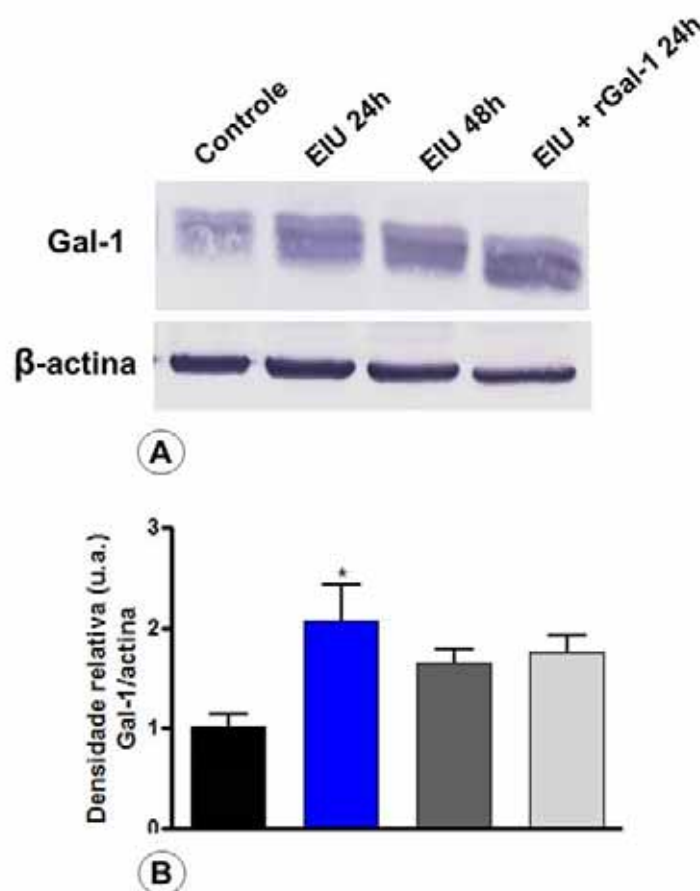


**Figura 10. Expressão da Gal-1 no segmento posterior do olho.** Imunorreatividade da Gal-1 no epitélio pigmentado da retina (epr), plexiformes externa (pe), interna (pi), e células ganglionares (g). Níveis inferiores de imunomarcção para Gal-1 foram detectados na EIU 48h [C]. [E] Nenhuma imunomarcção foi detectada no controle da reação. Cortes: 4  $\mu$ m. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 20  $\mu$ m. [F] Análise densitométrica da expressão da Gal-1 tecidos oculares (retina e EPR - epitélio pigmentado da retina). Os resultados (unidades arbitrárias - u.a.) foram obtidos como média  $\pm$  S.E.M. das nove fotomicrografias analisadas por tecido/ grupo experimental; #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$  versus EIU 24h.



#### 4.6. Quantificação da expressão endógena da proteína Gal-1 pela técnica de Western blotting

Para confirmar os dados obtidos nos estudos imuno-histoquímicos, realizamos a técnica de *Western blotting* para detectar a expressão da Gal-1 nos tecidos oculares dos animais (Figura 11A). A expressão aumentada da Gal-1 foi verificada no grupo EIU 24h em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 11B). Não houve diferença significativa da expressão da proteína entre os demais grupos.



**Figura 11. Expressão da Gal-1 no sobrenadante dos tecidos oculares. [A]** *Western blotting* representativo ilustrando a expressão da Gal-1 no sobrenadante, obtidos da maceração dos olhos intactos. **[B]** Densitometria das bandas de proteínas imunorreativas para Gal-1. Valores expressos como média  $\pm$  S.E.M. de unidades arbitrárias (u.a.) relativas para  $\beta$ -actina ( $n = 5$ /grupo). \* $p < 0,05$  versus controle.

## **5. DISCUSSÃO**

---

Apesar dos avanços na elucidação do papel da Gal-1 nos modelos de doenças autoimunes, com foco nas células T e B (RABINOVICH et al., 1999; LIU; RABINOVICH, 2010; MOCHIZUKI; SUGITA; KAMOI, 2012), incluindo uveíte, encefalomielite autoimune, artrite, hepatite e diabetes (RABINOVICH et al., 1999; SANTUCCI et al., 2000; TOSCANO et al., 2006; ILARREGUI et al., 2009), a expressão da Gal-1 e os efeitos da administração exógena dessa proteína, para as células da imunidade inata em processos inflamatórios no olho, foram pouco estudados. Por essa razão, o presente estudo teve como objetivo definir o perfil da expressão dessa proteína nos tecidos oculares controles e induzidos à uveíte por meio da aplicação de uma única injeção de LPS na pata de ratos (ROSENBAUM et al., 1980). Ainda, diante do risco dos efeitos adversos oferecidos pelas terapias atuais utilizadas para o tratamento da uveíte e, sabendo do efeito anti-inflamatório da Gal-1, avaliamos o mecanismo de ação endógena e exógena da Gal-1 na EIU.

Nossos resultados demonstraram que o estímulo inflamatório, induzido pelo LPS, ocasiona a liberação de mediadores inflamatórios MCP-1, IL-1 $\beta$  e IL-6 no olho e MCP-1, IL-6 e IL-10 no plasma. Alguns autores demonstraram que a fase aguda da inflamação ocorre após 24 horas da inoculação do LPS e a regressão do processo inflamatório, com diminuição do extravasamento leucocitário e dos mediadores químicos pró-inflamatórios, após 48 horas (BECKER et al., 2000; MEDEIROS et al., 2008; GIROL et al., 2013). Esses autores analisaram que os neutrófilos são as células inflamatórias predominantemente transmigradas, especialmente na região anterior do olho. Na EIU, a transmigração dos neutrófilos ocorre na base do corpo ciliar, enquanto o infiltrado de células fagocitárias mononucleares e linfócitos nos vasos da íris (MCMENAMIN; CREWE, 1995; GIROL et al., 2013). A expressão do receptor TLR4, por células presentes na região anterior do olho, pode explicar a aparente suscetibilidade da úvea anterior à quebra da barreira hemato-ocular e no desenvolvimento da uveíte anterior (BRITO et al., 2004; CHANG; MCCLUSKEY; WAKEFIELD, 2006; GIROL et al., 2013).

Na região posterior, o processo inflamatório foi menos evidente, com algumas células inflamatórias presentes na retina e no vítreo. Esses dados coincidem com os resultados obtidos recentemente no nosso laboratório por Girol et al. (2013), que investigaram o efeito anti-inflamatório da proteína Anexina-1 e do seu peptídeo mimético Ac2-26 na EIU em roedores. Esses pesquisadores demonstraram que o estímulo inflamatório, induzido pelo LPS, ocasiona liberação dos mediadores químicos TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO, aumento na expressão da enzima pró-inflamatória

COX-2, e intenso influxo de leucócitos na EIU 24h em ratos. Os dados de Yang et al. (1996), utilizando o modelo de EIU, também demonstraram que a migração celular é mais intensa após 24 horas, atingindo uma fase de resolução do processo inflamatório intra-ocular após 96 horas da inoculação do LPS.

O efeito da administração da rGal-1 nos animais inibe o recrutamento dos leucócitos para os tecidos oculares, humor aquoso e sangue, após 24 horas, indicando a ação anti-inflamatória dessa proteína. Esse efeito anti-inflamatório reduz os níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 nos tecidos oculares na EIU e IL-6 no plasma. Resultados semelhantes foram descritos em ensaios *in vivo*, mostrando que a pré-administração da Gal-1 inibe o extravasamento de células polimorfonucleares (PMNs) para a cavidade peritoneal após 4 horas da aplicação de carragenina em ratos (GIL et al., 2006a), IL-1 $\beta$  (LA et al., 2003) e zymosan em camundongos (GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Ainda, outro estudo revelou que a Gal-1 exógena é capaz de interferir nas etapas específicas do rolamento e adesão firme dos neutrófilos no endotélio, diminuindo sua transmigração para o tecido (COOPER; NORLING, PERRETTI, 2008). Além disso, o efeito anti-migratório da proteína foi associado com a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mas não IL-6 (GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Recentemente, Seropian et al. (2013) também demonstrou o efeito anti-inflamatório dessa proteína, indicando que uma única dose de rGal-1 (3 mg/Kg, i.p.) apresenta efeitos cardioprotetores em modelo de infarto agudo do miocárdio em camundongos.

As células fagocitárias mononucleares analisadas apresentaram aumento significativo no humor aquoso, na EIU 24h em relação ao grupo controle. Enquanto, o tratamento farmacológico com rGal-1 exacerbou o número dessas células em relação ao grupo EIU 24h, além de aumentar significativamente os níveis de MCP-1 no plasma. Resultado semelhante, em modelo clássico de peritonite induzida por zymosan, também mostrou aumento significativo no número de células fagocitárias mononucleares no lavado peritoneal de camundongos tratados com rGal-1 em relação aos não tratados após 24 horas (GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Esse dado indica o papel da Gal-1 na quimiotaxia dos monócitos, processo associado com a função de ligação dessa proteína com seu CRD (redução de 65% na presença de lactose) e com as vias da quinase MAP, como demonstrados por testes *in vitro* (MALIK et al., 2009). Adicionalmente, a administração exógena de Gal-1 parece desempenhar um papel na ativação dessas células, em particular em células

dendríticas, onde ocorre aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a quimiocina MCP-1 (FULCHER et al., 2006).

O acúmulo e a subsequente ativação dos leucócitos são eventos centrais na patogênese de todas as formas da inflamação. Por essa razão, a aquisição de informações, com relação aos mecanismos moleculares que regulam o acúmulo de leucócitos nos tecidos inflamados pode fornecer um melhor conhecimento da etiologia de patologias inflamatórias, sendo esses alvos originais para a terapia anti-inflamatória (PERRETTI, 1998). Nesse aspecto, muitos estudos demonstram a importância das moléculas de adesão L-selectina (CD62L) e  $\beta$ 2-integrina (CD11b) na transmigração de leucócitos para os sítios de injúria, representando pontos críticos na resposta imune do hospedeiro (ZARBOCK et al., 2011). Assim, avaliamos a porcentagem de leucócitos positivos para essas moléculas de adesão no sangue periférico, com o objetivo de verificar o mecanismo de ação da Gal-1 nesse modelo experimental.

Os dados obtidos na citometria de fluxo corroboraram com a quantificação de células inflamatórias, demonstrando aumento significativo na porcentagem de leucócitos CD62L<sup>+</sup> na fase aguda da inflamação (EIU 24h) em relação ao grupo controle, confirmando a ocorrência de ativação celular causada pelo LPS. No entanto, nesse mesmo tempo experimental, o efeito observado no grupo tratado com rGal-1 mostra diminuição no percentual desses leucócitos CD62L<sup>+</sup> e aumento de células CD11b<sup>+</sup>, confirmando o efeito da proteína na quimiotaxia de células fagocitárias mononucleares, atuando na resolução da resposta inflamatória. O mesmo efeito ocorre no grupo EIU 48h. O papel da Gal-1 na expressão dessas moléculas de adesão tem sido explorado na literatura, mostrando efeitos antagônicos que são dependentes da concentração e do modelo experimental. Estudos *in vitro*, usando neutrófilos humanos estimulados pelo fator ativador plaquetário (PAF), mostram que a Gal-1 não tem efeito na expressão de CD62L e CD11b em baixas concentrações (~2,75 a 27,5 nM), mas é capaz de inibir a captura e o rolamento dessas células sobre o endotélio (COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008). Ao contrário, em altas concentrações (~275 nM), a Gal-1 aumenta a adesão dos neutrófilos estimulados por PAF sobre o endotélio (COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008) e estimula a quimiotaxia dessas células (AUVYNET et al., 2013). Investigações *in vivo*, realizadas no nosso laboratório, também associaram o papel inibitório da Gal-1 exógena na transmigração dos neutrófilos, com aumento significativo na expressão de CD62L e CD11b nos tempos experimentais de 4h (fase

aguda da inflamação) e 24h (fase tardia - resolução) após indução de peritonite por zymosan (GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Por outro lado, esse papel anti-inflamatório da Gal-1 pode ser revertido para pró-inflamatório, se a administração intraperitoneal dessa lectina for realizada sem estímulo inflamatório em camundongos, levando ao aumento na migração de neutrófilos peritoneais e no percentual de células CD11b<sup>+</sup> (AUVYNET et al., 2013). Dessa maneira, no modelo experimental de uveíte utilizado nesse estudo, o efeito inibitório da Gal-1 no recrutamento dos leucócitos ocorreu possivelmente pela baixa concentração utilizada dessa lectina no tratamento farmacológico (3µg/100µL), produzindo mudança nas subpopulações de células que expressam essas moléculas de adesão e, assim, regulando negativamente a transmigração celular no tempo de 24 horas. Esse dado corrobora com os obtidos por La et al. (2003), os quais reportaram que a Gal-1 inibe o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal após indução por IL-1β, a quimiotaxia e migração transendotelial.

Nossas análises demonstraram que o tratamento com a Gal-1 diminui o número de neutrófilos no sangue e nos tecidos oculares, possivelmente bloqueando a migração de células progenitoras da medula óssea. Kiss et al. (2007) analisaram quantitativa e qualitativamente os leucócitos na medula óssea e no sangue derivados de camundongos submetidos ao regime de mobilização por ciclofosfamida (CY) e fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF), na presença ou ausência de rGal-1. O tratamento com Gal-1 bloqueou a migração de células progenitoras da medula óssea, assim como, a diminuição periférica da neutrofilia e monocitose de maneira dose e tempo-dependente. Esses pesquisadores concluíram que essa inibição da mobilização dessas células ocorre principalmente por via de obstrução da migração transendotelial de células derivadas da medula óssea, incluindo células hematopoiéticas, progenitoras mielóides comprometidas, granulócitos e monócitos maduros.

Após avaliar a atividade anti-inflamatória da Gal-1 exógena, analisamos a expressão da proteína endógena e o mecanismo de ação dessa proteína nesse modelo de EIU. A imunomarcagem para Gal-1 foi observada no segmento anterior do olho, especificamente nas células epiteliais da córnea, membrana conjuntiva, processos ciliares e íris, assim como nas células endoteliais. Esses resultados confirmam dados da literatura que mostram a expressão da Gal-1 no segmento anterior do olho humano (FAUTSCH; SILVA; JOHNSON, 2003), particularmente nos processos ciliares, seio venoso da esclera e células endoteliais (LA et al., 2003; GIL

et al., 2006a; GIL et al., 2006b), por meio das técnicas de RT-PCR, *Western blotting* e imunocitoquímica.

Na resposta inflamatória intraocular, induzida pelo LPS após 24 horas, ocorreu aumento significativo na expressão da Gal-1 endógena no segmento anterior do olho seguida de diminuição após tratamento farmacológico com essa proteína. A modulação da proteína Gal-1 também foi observada em modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos, no qual os neutrófilos apresentaram baixos níveis de Gal-1 endógena na fase inicial da inflamação (4 horas), aumentando após 24 horas (GIL et al., 2006b). Esse fato sugere um importante papel da proteína endógena na regulação da transmigração celular e resolução do processo. O tratamento farmacológico com a proteína Gal-1 inibe sua expressão endógena nessas células, provavelmente como um mecanismo de *feedback* negativo.

De maneira interessante, a imunorreatividade para a Gal-1 nos tecidos oculares coincide com os locais de expressão do TLR4 e produção de mediadores inflamatórios (BRITO et al., 2004; CHANG; MCCLUSKEY; WAKEFIELD, 2006; OOI et al., 2006; VAN LAAR; VAN HAGEN, 2006; CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2010; ZENKEL et al., 2010). No olho, o TLR4 é expresso, especialmente, por células epiteliais (córnea e epitélios pigmentado da retina e não pigmentado do corpo ciliar), células endoteliais da íris (BRITO et al., 2004; CHANG; MCCLUSKEY; WAKEFIELD, 2006) e células apresentadoras de antígenos residentes da úvea (BRITO et al., 2004; CHANG; MCCLUSKEY; WAKEFIELD, 2006; CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2010; LI et al., 2010). Na uveíte, as citocinas são produzidas principalmente pelas células inflamatórias e endoteliais, mas também, pelas células epiteliais da córnea e pigmentares da retina (OOI et al., 2006; VAN LAAR; VAN HAGEN, 2006; ZENKEL et al., 2010).

No segmento posterior do olho também observamos expressão da Gal-1 na retina, especificamente nas células ganglionares, nas camadas plexiformes interna e externa e no epitélio pigmentado em todos os grupos experimentais, indicando uma função estrutural da proteína nesse tecido. O tratamento farmacológico com a rGal-1 não produziu mudança significativa nos níveis dessa proteína em relação ao grupo EIU 24h. Alguns pesquisadores mostram a expressão da Gal-1 em retinas humanas, bovinas e de ratos, (UEHARA; OHBA; OZAWA, 2001; ROMERO et al., 2006). A investigação de Uehara et al. (2001) reportou o deslocamento da retina e o processo de vacuolização da camada plexiforme externa após administração intravitreal do anticorpo anti-Gal-1 nos olhos de ratos. Esses pesquisadores

sugerem que a Gal-1 atua na adesão dos fotorreceptores e da camada plexiforme externa por meio da interação com glicoconjugados específicos. Além disso, um aumento nos níveis de anticorpos anti-Gal-1 foi associado com a progressão da uveíte autoimune e infecciosa em humanos, cujas retinas apresentaram intensa imunorreatividade para Gal-1, principalmente na camada dos fotorreceptores (ROMERO et al., 2006).

Para validar nossos dados obtidos da análise imuno-histoquímica, os níveis de Gal-1 foram analisados no sobrenadante dos tecidos oculares de ratos após maceração, pela técnica de *Western blotting*. Como esperado, o nível de Gal-1 aumentou no grupo EIU 24 horas em relação ao controle. Porém não houve diferença de expressão entre os outros grupos estudados. Esse efeito pode ser explicado pelos métodos utilizados, pois os estudos imuno-histoquímicos localizaram a expressão diferencial da Gal-1 nos tecidos do segmento anterior e posterior do olho, pela quantificação por densitometria. Em contraste, o olho total foi utilizado para a obtenção do estudo do sobrenadante, o que permitiu a quantificação da Gal-1 em todos os tecidos e em combinação com células inflamatórias, humor aquoso e vítreo.

Concluindo, os nossos resultados mostram regulação das células inflamatórias e modulação da expressão da Gal-1 endógena nos tecidos oculares após 24 horas da inoculação do LPS, associada a uma reação inflamatória aguda, principalmente no segmento anterior do olho. O tratamento farmacológico com a rGal-1 revelou um papel exógeno anti-inflamatório relacionado com a modulação das células imunes inatas envolvidas na resposta inflamatória do olho, com diminuição da transmigração de neutrófilos para o tecido ocular e da expressão da molécula de adesão L-selectina, indicando essa proteína como um alvo potencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas nos processos de inflamação ocular.



## **6. CONCLUSÕES**

---

---

Os resultados obtidos, nas condições experimentais propostas, incluindo tratamento farmacológico com a proteína recombinante Galectina-1 (rGal-1), permitem concluir:

1. na EIU 24h ocorre aumento de leucócitos circulantes e influxo no humor aquoso e tecidos oculares causados pela liberação dos mediadores inflamatórios MCP-1, IL-1 $\beta$  e IL-6, com diminuição desse processo na EIU 48h;
2. o tratamento com rGal-1, após EIU 24h, diminui o número dos neutrófilos e aumenta a quimiotaxia das células fagocitárias mononucleares no humor aquoso e tecidos oculares, reduzindo os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6;
3. na EIU 24h ocorre aumento na porcentagem de leucócitos CD62L<sup>+</sup> e diminuição de CD11b<sup>+</sup>, enquanto na EIU 48h e pós tratamento com rGal-1 ocorre efeito inverso, aumento de CD11b<sup>+</sup> e CD62L/CD11b<sup>+</sup> e diminuição de CD62L<sup>+</sup>;
4. a expressão da Gal-1 endógena, em todos os grupos experimentais, ocorre no segmento anterior do olho, especialmente nos epitélios da córnea, membrana conjuntiva, processos ciliares, íris e células endoteliais e, na retina, no epitélio pigmentado, plexiformes externa e interna e células ganglionares;
5. a expressão da Gal-1, na EIU 24h, aumenta nos tecidos oculares da região anterior do olho, e não altera na retina;
6. os níveis totais da Gal-1 endógena no olho aumentam na EIU 24h.

Associadas, essas conclusões mostram que a Gal-1 está envolvida na fisiologia dos tecidos oculares nas condições normais e durante o estímulo inflamatório, apontando essa proteína como um alvo potencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas nos processos de inflamação ocular.

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

---

- AGRAWAL, R. V. et al. Current approach in diagnosis and management of anterior uveitis. **Indian J Ophthalmol**, v. 58, n. 1, p. 11-9, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1998-3689. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029142> >.
- ALGE, C. S. et al. Galectin-1 influences migration of retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 1, p. 415-26, Jan 2006. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16384992> >.
- ALTAN-YAYCIOGLU, R. et al. Inflammation of the posterior uvea: findings on fundus fluorescein and indocyanine green angiography. **Ocul Immunol Inflamm**, v. 14, n. 3, p. 171-9, Jun 2006. ISSN 0927-3948. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16766401> >.
- AUVYNET, C. et al. Galectin-1 promotes human neutrophil migration. **Glycobiology**, v. 23, n. 1, p. 32-42, Jan 2013. ISSN 1460-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22942212> >.
- BAO, L. et al. Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 17, p. 7803-7, Sep 2008. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18690680> >.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J Biol Chem**, v. 269, n. 33, p. 20807-10, Aug 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8063692> >.
- BECKER, M. D. et al. Digital video-imaging of leukocyte migration in the iris: intravital microscopy in a physiological model during the onset of endotoxin-induced uveitis. **J Immunol Methods**, v. 240, n. 1-2, p. 23-37, Jun 2000. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854598> >.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**, v. 40, n. 12, p. 845-59, Feb 2004. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698223> >.
- BLASER, C. et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 8, p. 2311-9, Aug 1998. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710209> >.
- BRITO, B. E. et al. Toll-like receptor 4 and CD14 expression in human ciliary body and TLR-4 in human iris endothelial cells. **Exp Eye Res**, v. 79, n. 2, p. 203-8, Aug 2004. ISSN 0014-4835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325567> >.
- BURGESS, W. H.; MACIAG, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Annu Rev Biochem**, v. 58, p. 575-606, 1989. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549857> >.
- CEDENO-LAURENT, F.; DIMITROFF, C. J. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. **Clin Immunol**, v. 142, n. 2, p. 107-16, Feb 2012. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019770> >.
- CELIK, I. et al. The prevalence of bacteraemia-related retinal lesions in seriously ill patients. **J Infect**, v. 52, n. 2, p. 97-104, Feb 2006. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15904970> >.
- CHANG, J. H. et al. Use of ocular hypotensive prostaglandin analogues in patients with uveitis: does their use increase anterior uveitis and cystoid macular oedema? **Br J Ophthalmol**, v. 92, n. 7, p. 916-21, Jul 2008. ISSN 1468-2079. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460537> >.
- CHANG, J. H.; MCCLUSKEY, P. J.; WAKEFIELD, D. Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. **Br J Ophthalmol**, v. 90, n. 1, p. 103-8, Jan 2006. ISSN 0007-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16361678> >.
- CHEN, W. et al. [Toll-like receptor 4 expression in macrophages in endotoxin-induced uveitis in Wistar rats]. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi**, v. 46, n. 4, p. 355-61, Apr 2010. ISSN 0412-4081. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654065> >.

\_\_\_\_\_. Expression of toll-like receptor 4 in uvea-resident tissue macrophages during endotoxin-induced uveitis. **Mol Vis**, v. 15, p. 619-28, 2009. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19347047> >.

CHIU, Y. T. et al. Septic metastatic endophthalmitis complicating *Klebsiella pneumoniae* scalp furuncle. **Eye (Lond)**, v. 21, n. 1, p. 142-4, Jan 2007. ISSN 0950-222X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16858445> >.

COOPER, D. et al. The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? **Ann N Y Acad Sci**, Jan 2012. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22256855> >.

\_\_\_\_\_. Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. **Methods Enzymol**, v. 480, p. 199-244, 2010. ISSN 1557-7988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816212> >.

COOPER, D.; NORLING, L. V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 6, p. 1459-66, Jun 2008. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372340> >.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, v. 9, n. 10, p. 979-84, Oct 1999. ISSN 0959-6658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521533> >.

CURNOW, S. J.; MURRAY, P. I. Inflammatory mediators of uveitis: cytokines and chemokines. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 17, n. 6, p. 532-7, Dec 2006. ISSN 1040-8738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065921> >.

DA SILVA, P. S.; GIROL, A. P.; OLIANI, S. M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. **Mol Vis**, v. 17, p. 1310-9, 2011. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633711> >.

DE KOZAK, Y. et al. Protein kinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) regulates ocular inflammation and apoptosis in endotoxin-induced uveitis (EIU): signaling molecules involved in EIU resolution by PKC $\zeta$  inhibitor and interleukin-13. **Am J Pathol**, v. 170, n. 4, p. 1241-57, Apr 2007. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392164> >.

DIAS-BARUFFI, M. et al. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 42, p. 41282-93, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853445> >.

DUNN, J. P. Review of immunosuppressive drug therapy in uveitis. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 15, n. 4, p. 293-8, Aug 2004. ISSN 1040-8738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232467> >.

DURRANI, O. M.; MEADS, C. A.; MURRAY, P. I. Uveitis: a potentially blinding disease. **Ophthalmologica**, v. 218, n. 4, p. 223-36, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 0030-3755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258410> >.

EARL, L. A.; BI, S.; BAUM, L. G. Galectin multimerization and lattice formation are regulated by linker region structure. **Glycobiology**, v. 21, n. 1, p. 6-12, Jan 2011. ISSN 1460-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20864568> >.

FAUTSCH, M. P.; SILVA, A. O.; JOHNSON, D. H. Carbohydrate binding proteins galectin-1 and galectin-3 in human trabecular meshwork. **Exp Eye Res**, v. 77, n. 1, p. 11-6, Jul 2003. ISSN 0014-4835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823983> >.

FULCHER, J. A. et al. Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 216-26, Jul 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785517> >.

- FUTAGAMI, Y. et al. Role of thrombospondin-1 in T cell response to ocular pigment epithelial cells. **J Immunol**, v. 178, n. 11, p. 6994-7005, Jun 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513749> >.
- GARÍN, M. I. et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2058-65, Mar 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110462> >.
- GAUDET, A. D. et al. Expression and functions of galectin-1 in sensory and motoneurons. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 4, p. 419-25, Jun 2005. ISSN 1389-4501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026260> >.
- GAUTHIER, L. et al. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 20, p. 13014-9, Oct 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12271131> >.
- GIL, C. D.; GULLO, C. E.; OLIANI, S. M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 1, p. 74-84, 2010. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228929> >.
- GIL, C. D. et al. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflamm Res**, v. 55, n. 3, p. 99-107, Mar 2006a. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16673152> >.
- GIL, C. D. et al. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 4, p. 338-44, Apr 2006b. ISSN 1065-6995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530434> >.
- GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 5, p. 401-16, May 2004. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136788> >.
- 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**, v. 190, n. 11, p. 5689-5701, Jun 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645879> >.
- GOLDRING, K. et al. The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 2, p. 355-66, Jan 2002. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839787> >.
- GOUREAU, O. et al. Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **J Immunol**, v. 154, n. 12, p. 6518-23, Jun 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539024> >.
- GUPTA, S. K. et al. The anti-inflammatory effects of Curcuma longa and Berberis aristata in endotoxin-induced uveitis in rabbits. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 49, n. 9, p. 4036-40, Sep 2008. ISSN 1552-5783. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18421073> >.
- HADARI, Y. R. et al. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. **J Cell Sci**, v. 113 ( Pt 13), p. 2385-97, Jul 2000. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852818> >.
- HAFEZI-MOGHADAM, A. et al. VLA-4 blockade suppresses endotoxin-induced uveitis: in vivo evidence for functional integrin up-regulation. **FASEB J**, v. 21, n. 2, p. 464-74, Feb 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202250> >.
- HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, n. 4, p. 297-304, Aug 1993. ISSN 0959-6658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8400545> >.

HORIE, S. et al. Human iris pigment epithelium suppresses activation of bystander T cells via TGFbeta-TGFbeta receptor interaction. **Exp Eye Res**, v. 88, n. 6, p. 1033-42, Jun 2009. ISSN 1096-0007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19450450> >.

ILARREGUI, J. M. et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. **Nat Immunol**, v. 10, n. 9, p. 981-91, Sep 2009. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668220> >.

IQBAL, A. J. et al. Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect. **Am J Pathol**, v. 178, n. 3, p. 1201-9, Mar 2011. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356371> >.

JACKSON, T. L. et al. Endogenous bacterial endophthalmitis: a 17-year prospective series and review of 267 reported cases. **Surv Ophthalmol**, v. 48, n. 4, p. 403-23, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0039-6257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850229> >.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 524p.

KALARIYA, N. M. et al. Preventive effects of ethyl pyruvate on endotoxin-induced uveitis in rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 8, p. 5144-52, Jul 2011. ISSN 1552-5783. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551413> >.

KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl 1, p. 39-47, Mar 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962097> >.

KISS, J. et al. A novel anti-inflammatory function of human galectin-1: inhibition of hematopoietic progenitor cell mobilization. **Exp Hematol**, v. 35, n. 2, p. 305-13, Feb 2007. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17258079> >.

LA, M. et al. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **Am J Pathol**, v. 163, n. 4, p. 1505-15, Oct 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507657> >.

LAMBIASE, A. et al. Toll-like receptors in ocular surface diseases: overview and new findings. **Clin Sci (Lond)**, v. 120, n. 10, p. 441-50, May 2011. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21271987> >.

LEFFLER, H. et al. Introduction to galectins. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p. 433-40, 2004. ISSN 0282-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758066> >.

LENNIKOV, A. et al. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an I $\kappa$ B kinase  $\beta$  inhibitor in rats. **Mol Vis**, v. 18, p. 2586-97, 2012. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23112571> >.

LI, S. et al. Expression of TLR4-MyD88 and NF- $\kappa$ B in the iris during endotoxin-induced uveitis. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 748218, 2010. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20847811> >.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A.. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1183, p. 158-82, Jan 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146714> >.

\_\_\_\_\_. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, Jan 2005. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630413> >.

MALIK, R. K. et al. Galectin-1 stimulates monocyte chemotaxis via the p44/42 MAP kinase pathway and a pertussis toxin-sensitive pathway. **Glycobiology**, v. 19, n. 12, p. 1402-7, Dec 2009. ISSN 1460-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561030> >.

MCMENAMIN, P. G.; CREWE, J. Endotoxin-induced uveitis. Kinetics and phenotype of the inflammatory cell infiltrate and the response of the resident tissue macrophages and dendritic cells in the iris and ciliary body. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 36, n. 10, p. 1949-59, Sep 1995. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657537> >.

MEDEIROS, R. et al. Molecular mechanisms of topical anti-inflammatory effects of lipoxin A(4) in endotoxin-induced uveitis. **Mol Pharmacol**, v. 74, n. 1, p. 154-61, Jul 2008. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413658> >.

MOCHIZUKI, M.; SUGITA, S.; KAMOI, K. Immunological homeostasis of the eye. **Prog Retin Eye Res**, v. 33, p. 10-27, Mar 2013. ISSN 1873-1635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23108335> >.

NORLING, L. V.; PERRETTI, M. The role of omega-3 derived resolvins in arthritis. **Curr Opin Pharmacol**, Feb 2013. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434193> >.

NORLING, L. V. et al. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. **FASEB J**, v. 22, n. 3, p. 682-90, Mar 2008. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965266> >.

NUSSENBLATT, R. B. The natural history of uveitis. **Int Ophthalmol**, v. 14, n. 5-6, p. 303-8, Oct 1990. ISSN 0165-5701. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249907> >.

OFFNER, H. et al. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v. 28, n. 2, p. 177-84, Jul 1990. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1694534> >.

OLIANI, S. M. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol**, v. 158, n. 2, p. 603-15, Feb 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159197> >.

OOI, K. G. et al. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? **Clin Med Res**, v. 4, n. 4, p. 294-309, Dec 2006. ISSN 1539-4182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210978> >.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 3, p. 537-50, Feb 1999. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10188959> >.

PATTERSON, R. J.; WANG, W.; WANG, J. L. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p. 499-506, 2004. ISSN 0282-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758073> >.

PAZ, A. et al. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. **Oncogene**, v. 20, n. 51, p. 7486-93, Nov 2001. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709720> >.

PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, n. 6, p. 402-12, May 1998. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625297> >.

PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 736-9, Dec 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501023> >.

PERONE, M. J. et al. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. **J Immunol**, v. 177, n. 8, p. 5278-89, Oct 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015713> >.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104500> >.



- PERRETTI, M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. **Gen Pharmacol**, v. 31, n. 4, p. 545-52, Oct 1998. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792213> >.
- POULAKI, V. et al. Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. **FASEB J**, v. 21, n. 9, p. 2113-23, Jul 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400913> >.
- RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 322-35, Mar 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22444630> >.
- RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; FAINBOIM, L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 5, p. 741-52, May 2002. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994498> >.
- RABINOVICH, G. A. et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends Immunol**, v. 23, n. 6, p. 313-20, Jun 2002. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072371> >.
- RABINOVICH, G. A. et al. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 5, p. 1331-9, May 2000. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820379> >.
- RABINOVICH, G. A. et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. **J Exp Med**, v. 190, n. 3, p. 385-98, Aug 1999. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430627> >.
- RABINOVICH, G. A. et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. **J Immunol**, v. 160, n. 10, p. 4831-40, May 1998. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590230> >.
- READ, R. W. Uveitis: advances in understanding of pathogenesis and treatment. **Curr Rheumatol Rep**, v. 8, n. 4, p. 260-6, Aug 2006. ISSN 1523-3774. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839504> >.
- ROBMAN, L. et al. Exposure to Chlamydia pneumoniae infection and progression of age-related macular degeneration. **Am J Epidemiol**, v. 161, n. 11, p. 1013-9, Jun 2005. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901621> >.
- RODRIGUES, G. B. et al. Preventive and therapeutic anti-inflammatory effects of systemic and topical thalidomide on endotoxin-induced uveitis in rats. **Exp Eye Res**, v. 84, n. 3, p. 553-60, Mar 2007. ISSN 0014-4835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223105> >.
- ROMERO, M. D. et al. Circulating anti-galectin-1 antibodies are associated with the severity of ocular disease in autoimmune and infectious uveitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 4, p. 1550-6, Apr 2006. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16565391> >.
- ROSENBAUM, J. T. et al. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. **Nature**, v. 286, n. 5773, p. 611-3, Aug 1980. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7402339> >.
- RUBINSTEIN, N. et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. **Cancer Cell**, v. 5, n. 3, p. 241-51, Mar 2004. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050916> >.
- RUIZ-MORENO, J. M.; THILLAYE, B.; DE KOZAK, Y. Retino-choroidal changes in endotoxin-induced uveitis in the rat. **Ophthalmic Res**, v. 24, n. 3, p. 162-8, 1992. ISSN 0030-3747. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1407958> >.

- SANTUCCI, L. et al. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, v. 31, n. 2, p. 399-406, Feb 2000. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655263> >.
- SEROPIAN, I. M. et al. Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. **Am J Pathol**, v. 182, n. 1, p. 29-40, Jan 2013. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142379> >.
- THIJSEN, V. L. et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 43, p. 15975-80, Oct 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043243> >.
- TOSCANO, M. A. et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **J Immunol**, v. 176, n. 10, p. 6323-32, May 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670344> >.
- TSUCHIYAMA, Y. et al. Efficacy of galectins in the amelioration of nephrotoxic serum nephritis in Wistar Kyoto rats. **Kidney Int**, v. 58, n. 5, p. 1941-52, Nov 2000. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11044214> >.
- UEHARA, F.; OHBA, N.; OZAWA, M. Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 10, p. 2164-72, Sep 2001. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527926> >.
- VAN LAAR, J. A.; VAN HAGEN, P. M. Cytokines in uveitis. **Clin Med Res**, v. 4, n. 4, p. 248-9, Dec 2006. ISSN 1539-4182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210973> >.
- WAKEFIELD, D.; CHANG, J. H. Epidemiology of uveitis. **Int Ophthalmol Clin**, v. 45, n. 2, p. 1-13, 2005. ISSN 0020-8167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15791154> >.
- WOYNAROWSKA, B. et al. Inhibition of lectin-mediated ovarian tumor cell adhesion by sugar analogs. **J Biol Chem**, v. 269, n. 36, p. 22797-803, Sep 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077232> >.
- YADAV, U. C.; SUBRAMANYAM, S.; RAMANA, K. V. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 5, p. 2276-82, May 2009. ISSN 1552-5783. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136698> >.
- YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Rev Mol Med**, v. 10, p. e17, 2008. ISSN 1462-3994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549522> >.
- YANG, P. et al. Visualization of cell death in vivo during murine endotoxin-induced uveitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 5, p. 1993-7, May 2003. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714634> >.
- YANG, P.; DE VOS, A. F.; KIJLSTRA, A. Macrophages in the retina of normal Lewis rats and their dynamics after injection of lipopolysaccharide. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 37, n. 1, p. 77-85, Jan 1996. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550337> >.
- ZARBOCK, A. et al. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. **Blood**, v. 118, n. 26, p. 6743-51, Dec 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021370> >.
- ZENKEL, M. et al. Proinflammatory cytokines are involved in the initiation of the abnormal matrix process in pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. **Am J Pathol**, v. 176, n. 6, p. 2868-79, Jun 2010. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395431> >.
- ZUÑIGA, E. et al. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 1, p. 73-9, Jul 2001. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435488> >.

## ***APÉNDICE***

---

**Protective effects of the galectin-1 protein on in vivo and in vitro models of ocular inflammation**

**Short title: Gal-1 in ocular inflammation**

Caroline de Freitas Zanon,\* Nathália Martins Sonehara,\* Ana Paula Girol,<sup>†</sup> Cristiane Damas Gil,<sup>‡</sup> and Sonia Maria Oliani\*

\*Departament of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas; São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil, 15054-000

<sup>†</sup>Department of Physical and Biological Sciences, Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, Brazil, 15.809-144

<sup>‡</sup>Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil, 04023-900;

Corresponding author: Sonia Maria Oliani. Departament of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas; São Paulo State University (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Telephone +55 17 3221-2380, Fax: +55 17 3221-2390, E-mail: smoliani@ibilce.unesp.br

**Author's contributions:** CFZ and NMS contributed equally to this research.

**Disclosure:** The authors have no competing financial interests to disclose in relation to this manuscript.

**Abstract**

Galectin-1 (Gal-1) is a  $\beta$ -galactoside-binding protein with diverse biological activities in the pathogenesis of inflammation, but poorly investigated in ocular inflammation. In this study, the mechanism of Gal-1 action was monitored using *in vivo* and *in vitro* models of ocular inflammation. Treatment with recombinant Gal-1 (rGal-1; 3  $\mu$ g/animal) attenuated the histopathological manifestation of endotoxin-induced uveitis (EIU) by inhibiting the PMN infiltration in the eye, causing an imbalance in adhesion molecule expression and suppressing IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 production. Furthermore, immunohistochemical and Western blotting analyses revealed significant upregulation of Gal-1 in the eyes in EIU 24 hours. Additionally *in vitro* studies were performed using human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells, which are a major source of cytokines that regulate the inflammatory response in the retina. Ultrastructural immunocytochemical analyses showed decreased levels of endogenous Gal-1 in LPS-stimulated cells (10  $\mu$ g/mL) after 24 hours, while dexamethasone (Dex) treatment upregulated this protein. The protective effects of rGal-1 (4  $\mu$ g/mL) on LPS-stimulated cells were associated with a significant reduction of IL-6 and IL-8 release after 24 hours, similar to Dex treatment. Furthermore, rGal-1 and Dex inhibited cyclooxygenase-2 expression on LPS-stimulated cells after 24 hours, as shown by immunofluorescence. Taken together, our data highlight the role of Gal-1 in ocular inflammation, especially in uveitis, and indicate its potential use as a therapeutic approach.

**Keywords:** Galectin-1, endotoxin-induced uveitis, retinal pigment epithelium, inflammation.

## Introduction

The eye is protected from invasive pathogens by the presence of many factors, including the retinal pigmented epithelium (RPE), the main component of the blood-retinal barrier.<sup>1-3</sup> When this barrier is disrupted, the regional immune system of the eye suppresses pathogenic T cells and protects the eye. Because of this unique feature, this organ is considered to be an immune-privileged site, similar to the brain and testes.<sup>3</sup> However, some inflammatory processes can cause damage to ocular tissues such as uveitis, an intraocular disorder induced via autoimmune mechanisms or infectious agents<sup>3,4</sup> that constitutes an important cause of blindness worldwide.<sup>5</sup>

Endotoxin-induced uveitis (EIU) is a widely accepted animal model for improving our understanding of ocular inflammation.<sup>6-8</sup> Lipopolysaccharide (LPS) is an exogenous bacterial toxin used in the induction of EIU because it binds to toll-like receptor 4 (TLR4)<sup>9</sup> and stimulates the synthesis and the release of proinflammatory chemical mediators, such as nitric oxide (NO),<sup>7, 10</sup> platelet-activating factor (PAF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)<sup>11</sup> and other cytokines..<sup>12, 13</sup> This increased expression of inflammatory mediators exacerbates the development of uveitis by breaking down the blood-ocular barrier, which leads to edema formation and contributes to leukocyte influx.<sup>12, 14, 15</sup>

The pharmacological treatments for uveitis include corticosteroids and chemotherapeutic agents, but the side effects of these drugs, such as increased ocular pressure and cytotoxicity, limit their use and highlight the need for new therapeutic approaches.<sup>8, 16-18</sup> Among the available anti-inflammatory mediators, the Galectin-1 protein (Gal-1) in particular acts to limit the development of an acute inflammatory process.<sup>19-23</sup>

Galectins are lectin family members defined by their affinity for  $\beta$ -galactoside carbohydrates and their shared consensus amino acid sequences in the

carbohydrate recognition domain (CRD). They are widely expressed in various tissues and organs, showing highest expression in the immune system.<sup>24, 25</sup> Galectin-1 (Gal-1) is a prototypic member of this family that modulates cellular signaling, proliferation and survival and plays critical roles in the control of acute and chronic inflammation and neovascularization.<sup>20, 25-30</sup>

Gal-1 expression has been observed in several cell types related to inflammatory processes, including neutrophils and mast cells,<sup>31, 32</sup> macrophages,<sup>33</sup> T and B lymphocytes<sup>34, 35</sup> and endothelial cells,<sup>31, 32, 36</sup> suggesting an important role in the generation and the maintenance of immunological tolerance.

The anti-inflammatory properties of Gal-1 have been described in several models of chronic and autoimmune inflammation, including autoimmune encephalomyelitis,<sup>37</sup> arthritis,<sup>38</sup> uveitis,<sup>39</sup> hepatitis<sup>21</sup> and diabetes.<sup>40</sup> This protein participates in the interaction between the cell surface and extracellular matrix through binding to glycoconjugated proteins<sup>41</sup> and inhibits the rolling and extravasation of polymorphonuclear cells (PMN) into sites of inflammation.<sup>23</sup>

Although the anti-inflammatory activities of Gal-1 have been explored in several in vivo and in vitro investigations,<sup>29, 36, 42-44</sup> the exogenous role of this protein in ocular inflammatory processes has been poorly elucidated. Given the common side effects of the current therapies used to treat uveitis,<sup>16-18</sup> we evaluated the effects of endogenous and exogenous Gal-1 protein in rodent ocular tissues with EIU and in an in vitro LPS-inflamed RPE human cell system and further examined the Gal-1 mechanism of action. These analyses shed light on the genesis of the role of Gal-1 in ocular inflammation, especially uveitis, and indicate its potential for use as a therapeutic approach.

## **Materials and Methods**

### *In vivo studies*

#### *Animals*

Male rats of the species *Rattus norvegicus* weighing 150–200 g were randomly distributed into four groups (n = 12/group). The animals were housed under a 12-h light-dark cycle and were allowed access to food and water ad libitum. All of the experiments were conducted in compliance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of São José do Rio Preto Medical School (No. 0467/2009).

#### *Experimental model of uveitis and treatment protocols*

To induce EIU development, the rats were inoculated in the right paw with 1 mg/kg *Escherichia coli* LPS (serotype 0127: B8; Sigma Chemical, Poole, Dorset, UK) diluted in 0.1 mL of PBS.<sup>45</sup> The animals were then maintained under these conditions for 24 hours (n = 12) or 48 hours (n = 12).

The therapeutic efficacy of a recombinant Gal-1 (rGal-1) protein was tested in the EIU animals for 24 hours (n = 12/group). The rats were inoculated with LPS as described above, and after 15 minutes, they were treated intraperitoneally (i.p.) with rGal-1 (Peprotech, EC td, London, UK) at a concentration of 3 µg per animal,<sup>31</sup> then sacrificed after 24 hours. Untreated animals (n = 10) were used as controls.

The animals were anesthetized with isoflurane (1%) before all experimental treatments and were sacrificed through an overdose of the anesthetic.

#### *Quantitative analysis of leukocytes in AqH and blood*

AqH was collected from the right eyes of the rats (n = 5) by puncturing the anterior chamber with a 28-gauge needle, and a 10 µL aliquot of AqH was stained with Turk



solution (90 µL). Blood was collected through cardiac puncture (n = 7), and a 10 µL sample of whole blood was diluted in 190 µL of Turk solution. Neutrophils (Nø) and monocytes/macrophages (mono-Mø) were quantified in a Neubauer chamber (Laboroptik; Friedrichsdorf, Hessen, Germany). Data are reported as the mean ± SEM of the average number of cells x 10<sup>5</sup>/mL in the AqH samples and the number of cells x 10<sup>3</sup>/mL in the blood samples.

#### *Histopathological analysis*

After collecting AqH, the right eyes of the control and experimental rats (n = 5/group) were fixed in a 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde solution (1:1) in sodium cacodylate buffer 0.1 M (pH 7.4) for 24 hours at 4 ° C, then bisected. A portion of these eye fragments were dehydrated using graded methanol solutions and embedded in LR Gold resin (London Resin; Reading, Berkshire, UK)<sup>46</sup> for histopathology, while the other portion was embedded in paraffin for immunohistochemistry.

Quantitative analysis of neutrophils was performed in 1 µm tissue sections from the anterior and posterior eye segments in a blind fashion, with counting being performed using a high-power objective (40X) on an Axioskop 2-Mot Plus Zeiss microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The number of neutrophils was quantified in three semi-serial sections per animal with a 30 µm distance between each section, and the values are reported as the mean (± SEM) number of cells/mm<sup>2</sup>.

#### *Blood Flow Cytometry*

To quantify L-selectin (CD62L) and β2-integrin (CD11b) expression under different experimental conditions, leukocytes were isolated from whole blood collected in EDTA (100 mg/mL) via cardiac puncture (n = 7/group). Aliquots (10 µL) of animal

blood were incubated with 1  $\mu$ L of a monoclonal antibody against L-selectin conjugated with PE (anti-rat CD62L) and  $\beta$ 2-integrin conjugated with FITC (anti-rat CD11b) (BD Pharmingen, San Diego, USA) diluted in 8  $\mu$ L of PBS (1: 10) for 20 minutes at 4 ° C in the dark.

Immediately after incubation, 180  $\mu$ L of Guava Lysing Solution / Fixative (Millipore Corporation, USA) was added to lyse and fix the cells for 20 minutes at 37°C. The cells were analyzed using a Guava easyCyte flow cytometer (Millipore Corporation, USA), and leukocytes were separated according to their size and granularity. Data were obtained from 10,000 cells (only morphologically viable neutrophils were considered in the analysis) to determine the percentages (%) of CD62L<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells.

#### *Western blotting*

To detect total amounts of Gal-1 the left eyes of rats subjected to different experimental conditions were macerated in liquid nitrogen, lysed on ice for 15 min with 1 mL of a solution containing one complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture tablet (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1% Triton-X, pH 7.4. The samples were then transferred to microtubes and centrifuged at 12,000 rpm for 20 min at 4°C. The protein concentration in the eye supernatants was measured using the BCA <sup>™</sup> Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). All protein samples were stored in aliquots at -80° C until analysis.

Equal amounts of rat samples (31,5  $\mu$ g) and molecular weight markers were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gel according to the Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, USA) protocol and transferred to nitrocellulose membranes (Hi-Bond C, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Gal-1 was detected in rat samples using the rabbit polyclonal antibody anti-Gal-1 (3  $\mu\text{g/mL}$ ) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK) and  $\beta$ -actin with the rabbit antibody IgG, 1:500 (BioLegend, San Diego, CA, USA). Western Breeze Immunodetection kit (Invitrogen, Frederick, MD, USA) was used to chromogenic detection of bands. Protein densitometry was performed using the software ImageJ 1.440 (HIH, Bethesda, MD) to determine relative expression (arbitrary units, a.u.) of Gal-1/ $\beta$ -actin.

### *Immunohistochemistry*

To study specific localization of Gal-1, 5- $\mu\text{m}$  sections of paraffin-embedded eyes were employed. Following an Ag retrieval step using citrate buffer (pH 6), endogenous peroxide activity was blocked, and the sections were incubated overnight at 4°C with a primary rabbit polyclonal anti-Gal-1 Ab (1:200) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK) diluted in 1% BSA. After washing, the sections were incubated with a biotinylated secondary Ab (KIT Histostain-SP – Invitrogen, Frederick, MD, USA). Positive staining was detected using a peroxidase-conjugated Streptavidin complex, and the color was developed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as a substrate (Invitrogen, Frederick, MD, USA). The sections were counterstained with hematoxylin.

For densitometric analyses, three slides from each animal were used, and 20 points were analyzed in three fields in the cornea, ciliary processes, and inner plexiform layer of the retina. In addition, 10 points were marked on the iris, the outer plexiform and ganglion cells of the retina to obtain an average related to the intensity of immunoreactivity. The values were obtained as arbitrary units (a.u.).

### *In vitro studies*

#### *Cell culture and treatment protocols*

ARPE-19 cells (derived from human RPE; American Type Culture Collection) were grown in a mixture (1:1) of DMEM and Ham F-12 (Cultilab, Campinas, Brazil)<sup>47</sup> supplemented with 10% FBS, 200 mM L-glutamine, 0.1 mg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin (Invitrogen, Frederick, MD, USA).

To determine the optimal length of treatment with rGal-1 (Peprotech, EC td, London, UK), ARPE-19 cells were initially cultivated in complete medium, as described previously, and incubated with 10 µg/mL LPS (type *Escherichia coli*, serotype 0127:B8; Sigma Chemical) for 2, 8, 24, or 48 hours. The tested LPS concentration was chosen based on a study that used the same cell line.<sup>8</sup> To evaluate the anti-inflammatory effect of Gal-1, 0.04, 0.4 and 4.0 µg/mL of rGal-1 were tested in the LPS-activated cells.<sup>20, 36</sup> As positive control for anti-inflammatory effects on LPS-activated cells, we used the glucocorticoid dexamethasone (Dex) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 1.0 µM<sup>48</sup> (five independent experiments/group). Subsequently, the supernatants were collected to measure the levels of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. The results revealed that the 4.0 µg/mL concentration of rGal-1 was the best effective in significantly reducing the levels of both cytokine compared with LPS-activated cells. After determining the best treatment protocol, we established the experimental design. Cells were subjected to the following experimental conditions: growth in complete medium (control), activation by LPS (10 µg/mL) without treatment or treated with 4.0 µg/mL of rGal-1 (LPS/rGal-1) or 1.0 µM of Dex (LPS/Dex). The cytotoxic effect of rGal-1 with regard to the proliferation and viability of ARPE-19 cells was investigated in all experimental groups at 2, 8, 24 and 48 h. The cells were trypsinized and quantified using a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Frederick, MD, USA). The results revealed no significant differences in the rate of cell proliferation or cell viability among the experimental groups compared with their respective controls. Cellular

morphology was evaluated using an inverted microscope (CKX41; Olympus). The experimental procedures were conducted in accordance with the rules of the Research Ethics Committee of the Institute of Bioscience, Letters and Exact Science, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto (n° 041/11).

*Fixation, processing, and embedding for transmission electron microscopy*

ARPE-19 cells were fixed in a 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde solution (1:1) in sodium cacodylate buffer 0.1 M (pH 7.4) for 24 hours at 4 ° C. The cells were subsequently dehydrated through a methanol series and embedded in LRGold (London Resin; Reading, Berkshire, UK)

*Postembedding Immunogold Labeling*

To detect the localization of the endogenous Gal-1 protein, ultrathin sections (70 nm) of ARPE cells were sequentially incubated with the following reagents at room temperature: i) distilled water; ii) phosphate-buffered solution (PBS) containing 1% egg albumin (PBEA) for 10 min; iii) PBS containing 5% egg albumin (PBEA) for 30 min; iv) rabbit polyclonal anti-Gal-1 (1:100; Zymed Laboratories, Cambridge, U.K) for 2 hours, with normal rabbit serum as a control (1:100); and v) PBEA containing 0.01% Tween 20 in three washes (5 minutes each). To detect Gal-1, a goat anti-rabbit IgG antibody (1:50 in PBEA) conjugated with 15 nm colloidal gold (British Biocell, Cardiff, UK) was applied. After 1 hour, the sections were washed thoroughly in PBEA containing 0.01% Tween 20 and then in distilled water. These sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined using a ZEISS Leo 906 electron microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Randomly photographed sections of retinal pigment epithelium were used for immunocytochemical analysis. The area of the cell compartment was determined with AxioVision software on a

Zeiss-Axioskop 2 light microscope. The density of immunogold particles (number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$ ) was calculated and expressed for each cell compartment. Values are reported as the mean  $\pm$  SEM of ten electron micrographs analyzed per group.

#### *Immunofluorescence analysis*

To detect COX-2, ARPE-19 cells were grown on coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, washed in PBS, Tween 20 (0.4%), blocked with 1% BSA diluted in 3% normal goat serum, and incubated with a polyclonal rabbit anti-COX-2 Ab (Abcam, Cambridge, UK) (1:200 in normal goat serum 1.5%). After washing, the cells were incubated with a fluorescent anti-rabbit IgG, FITC Ab (Serotec, Oxford, UK) (1:100 in normal goat serum 1.5%) for 1 h. The slides were mounted with a solution containing glycerol and PBS (1:1). Normal goat serum was used in the reaction control. The cells were analyzed using a filter with a wavelength of 546 nm on an Axioskop 2-Mot Plus Zeiss microscope, and the levels of the enzyme were quantified via densitometry.

#### *Procedures in vivo and in vitro*

##### *Quantitative analysis of chemical mediators in the supernatants of ocular tissues and ARPE-19 cells*

The levels of MCP-1, IL-1 $\beta$  and IL-6, chemical mediators generally linked to EIU,<sup>11, 14</sup> were analyzed in the supernatants of the ocular tissues obtained following maceration.. On the other hand, the cytokines IL-6 and IL-8 are the chemical mediators released in the largest quantities by ARPE-19 cells following LPS activation for 24 hours;<sup>2, 8</sup> therefore, they were analyzed in the cell supernatants under all experimental conditions.

For these tests, 25 µL of the ocular tissue supernatant were employed, using the MILLIPLEX MAP KIT for rat cytokines (RECYTMAG-65K; Millipore Corporation, USA) and analyzed with LUMINEX xMAP MAGPIX (Millipore Corporation, USA) according to the manufacturer's instructions. For the in vitro analyses, 50 µL of the ARPE-19 cell supernatants were used, and all tests were performed with commercially available immunoassay kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The respective cytokine concentrations were determined with an OD reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### *Statistical analysis*

The data were analyzed using GraphPad software version 5.00. The results were previously subjected to descriptive analysis and determination of normality using the Kolmogorov-Smirnov test. For samples with a normal distribution, we applied analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni post hoc test for multiple comparisons or t tests for unpaired samples. The Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test was used for samples with a non-normal distribution. p values < 0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### *rGal-1 attenuates ocular inflammation detected via histopathological analysis of ocular tissues*

In the eyes of control rats an absence of transmigrated leukocytes was observed in the anterior (Figure 1A and B) and posterior (Figure 1C) segments. In contrast, 24 hours after intraocular injection of LPS (EIU 24 h), an influx of leukocytes, especially neutrophils, was detected in the anterior ocular segment, followed by transmigration

to the AqH, as well as in the stroma of the iris, ciliary processes (Figure 1D) and limbus (Figure 1E). In addition, the posterior segment of the eye presented neutrophils that transmigrated to the vitreous and retina, especially in the inner plexiform layer (Figure 1F). Treatment with rGal-1 induced a decrease in the number of transmigrated leukocytes in both the anterior (Figure 1J, K and M) and the posterior (Figure 1L and N) segments compared with the EIU 24 h animals.

The reduced number of transmigrated cells in the pharmacologically treated group was similar to that observed in the EIU 48 h animals, which achieved temporal remission of the inflammatory process. The numbers of neutrophils were significantly reduced in the anterior (Figure 1G, H and M) and posterior (Figure 1I and N) segments at this time point compared to the same ocular compartments at 24 hours after EIU.

*rGal-1 inhibits neutrophil influx and enhances the recruitment of mononuclear phagocytic cells in the AqH and blood in EIU*

At 24 hours after EIU induction, an intense inflammatory response characterized by a significant increase in the number of neutrophils in the AqH and blood was detected compared to the control group. In the late phase of inflammation (EIU 48 h), we observed a significant decrease in the number of neutrophils in these two compartments compared to the EIU 24 h group.

The effect of pharmacological treatment with rGal-1 on the recruitment of leukocytes was also evaluated, revealing a significant decrease in the number of neutrophils in the AqH and blood (Table 1) compared with the untreated EIU 24 h group. Quantification of mononuclear phagocytic cells showed exacerbated number of these cells following treatment with rGal-1 in the AqH and blood (Table 1) compared to the EIU 24 h and control groups.



*In vivo administration of rGal-1 reduces proinflammatory mediator release during EIU*

As expected, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 increased significantly in the eyes of the EIU 24 h animals (Table 2). Administration of rGal-1 decreased the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 after 24 hours compared with the untreated EIU 24 h animals. In addition, the administration of rGal-1 induced a significant decrease of chemokine MCP-1 compared to the EIU 24 h group (Table 2). Similar reductions in cytokine secretion were observed in the EIU 48 h group, confirming the temporal resolution of the inflammatory process.

*Gal-1 modifies leukocyte subpopulations via modulation of the adhesion molecules L-selectin and  $\beta$ 2-integrin*

The expression of adhesion molecules on neutrophils in the peripheral blood was investigated under the different experimental conditions via flow cytometry. The analysis of dot plot graphs demonstrated a high incidence of CD62L<sup>+</sup> neutrophils (Figure 2B) compared to the control groups (Figure 2A). However, the EIU 48 h and EIU+rGal-1 24 h groups showed a high incidence of CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells (Figure 2C and D) and a low percentage of CD62L<sup>+</sup> cells. Analysis of the percentages of CD62L<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> and CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells confirmed this observation (Figure 2F, G and H). The EIU 24 h without treatment was associated with a significant increase in CD62L<sup>+</sup> neutrophils compared with the control group (Figure 2F), while pharmacological treatment with rGal-1 reduced the percentage of CD62L<sup>+</sup> cells and significantly increased the percentages of CD11b<sup>+</sup> (Figure 2G) and CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> neutrophils (Figure 2H). Similar data were obtained in the EIU 48 h group. Unlabelled cells were used as a negative control (Figure 2E).

*Endogenous Gal-1 expression is upregulated in the anterior eye segment during EIU inflammation*

Immunohistochemistry analysis demonstrated the presence of Gal-1 expression in the epithelia of the cornea, iris and ciliary processes (Figure 3A, B and C). There was an increase in Gal-1 expression in these regions in the EIU 24 h group (Figure 3D, E and F) compared with the control group. However, we observed reduced expression of Gal-1 in the ciliary processes in the EIU 48 h group (Figure 3H) and in EIU 24 h animals treated with rGal-1 (Figure 3K). There was no immunostaining in the eye used as a negative control (Figure 3M).

The data obtained through Western blotting analysis confirmed the modulation of Gal-1 protein at the early inflammation time point (EIU 24 h), due to an increase in its endogenous expression in supernatants of ocular tissues (Figure 4A and B).

*Gal-1 expression is modulated in the RPE following endotoxin induction*

The retinal layers showed immunostaining for Gal-1, mainly in the retinal pigment epithelium, outer and inner plexiform strata and ganglion cells of all studied groups (Figure 5A, B, C and D). Densitometry revealed a similar immunostaining pattern in these retinal layers among the control, EIU 24 h and EIU+rGal-1 24 h groups, indicating that this protein is a structural component of this region (Figure 5F). However, there was a reduction in protein expression in group EIU 48 h (Figure 5C and F). No immunostaining was detected in the ocular tissues used in the control reactions (Figure 5E).

In addition, to correlate the in vivo findings with other quantitative assays, we determined the endogenous expression of Gal-1 in retinal pigment epithelial cells (ARPE-19 cells/ RPE) via transmission electron microscopy. Gal-1 immunogold labeling was detected in the RPE in the plasma membrane, cytoplasm, and nucleus

(Figure 5G, H, I and J). LPS-activated cells showed weak Gal-1 immunoreactivity in their subcellular compartments after 2 and 24 hours (Figure 5H) compared to the control group (Figure 5G). Dex treatment increased Gal-1 expression in these cells after 24 hours (Figure 5J). These ultrastructural observations were confirmed by the data on the density of gold particles in these cells (Figure 5L). No labeling was detected in the control section (Figure 5K).

*Gal-1 downregulates proinflammatory cytokine secretion and cytoplasmic COX-2 expression in the ARPE-19 cells*

Considering that in vivo LPS-induced ocular inflammation enhanced neutrophil infiltration and cytokine secretion, which were reversed by Gal-1 treatment, we investigated the role of the Gal-1 in the secretion of chemotactic cytokines and the cellular localization of COX-2 in LPS-stimulated ARPE-19 cells. Because LPS induces RPE cells to secrete high levels of IL-6 and IL-8 (Table 3), we checked for the presence of these mediators in the cell supernatants under the various experimental conditions. We observed significant increases in the levels of IL-6 and IL-8 in the LPS groups relative to the controls (Table 3). However, treatment with the three tested concentrations of rGal-1 (0.04, 0.4 and 4.0 µg/ml) significantly reduced the levels of these cytokines. The rGal-1 groups showed similar patterns of the levels of both cytokines to the untreated control groups, specially at the 4.0 µg/ml concentration.

Immunofluorescence analysis of COX-2 expression at 24 hours revealed intense cytoplasmic positivity in the LPS group (Figure 6B) compared to control cells (Figure 6A). Pharmacological treatment with rGal-1 (4 µg/mL) decreased COX-2 immunoreactivity in the cytoplasm of these cells (Figure 6C) compared with untreated cells (Figure 6A). There was no difference in immunofluorescence intensity between

the cytoplasm and nucleus in the LPS/rGal-1 group (Figure 6E). After 24 hours of treatment with Dex, the cells showed reduced cytoplasmic immunoreactivity (Figure 6D and E).

## **Discussion**

Despite advances in elucidating the role of Gal-1 in models of autoimmune diseases, its expression and effects on innate immune cells in ocular inflammatory processes have been poorly studied.<sup>3, 20, 25</sup> In this study, we developed *in vivo* and *in vitro* experimental models to evaluate different aspects of the actions of Gal-1 in the ocular tissues under inflammatory conditions.

Our *in vivo* analyses showed that the inflammatory stimulus induced by LPS caused release of proinflammatory mediators (MCP-1, IL1 $\beta$  and IL-6) in the eye, promoting the breakdown of the blood-ocular barrier and an intense influx of leukocytes in the ocular tissues. The peak of inflammation occurred 24 hours after LPS administration, and the inflammatory process regressed in a temporal manner, with decreased leukocyte extravasation and levels of proinflammatory mediators being detected in the EIU 48 h animals.<sup>8, 12, 49</sup> These results are consistent with the findings of an investigation performed in our laboratory demonstrating the anti-inflammatory effects of the Annexin-1 protein in EIU, especially for its N-terminal mimetic peptide (Ac2-26)<sup>8</sup>. In this study, the inflammatory stimulus induced by LPS caused the release of chemical mediators (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and NO), increased expression of proinflammatory COX-2 and an influx of leukocytes in the EIU 24 h group.

Treatment with rGal-1 revealed the anti-inflammatory activities of this protein through decreasing the leukocyte influx into ocular tissues, AqH and blood and reducing the production of IL-1 $\beta$  and IL-6 in ocular tissues during EIU.

These findings are in line with *in vivo* tests showing that pre-administration of Gal-1 inhibits the extravasation of PMNs into the peritoneal cavity 4 hours after the administration of carrageenan in rats<sup>31</sup> and IL-1 $\beta$ <sup>36</sup> and zymosan in mice.<sup>43</sup> Another study showed that exogenous Gal-1 is able to interfere with specific stages of rolling and the firm adhesion of neutrophils to the endothelium, decreasing their transmigration into tissue.<sup>50</sup> Additionally, the anti-migratory effect of this protein was shown to be associated with inhibition of the release of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but not that of IL-6.<sup>43</sup> Recently, an anti-inflammatory role of this protein was demonstrated in the heart through administering a single dose of rGal-1 (3 mg/Kg *i.p.*), which produced powerful cardioprotective effects against acute myocardial infarction in a mouse model.<sup>29</sup>

The EIU 24 h treatment also produced a significant increase in mononuclear phagocytic cells in the AqH and blood compared with the control group, which was exacerbated by pharmacological treatment with rGal-1. This effect of Gal-1 was associated with a significant increase in MCP-1 levels. These results are consistent with *in vitro* assays demonstrating the role of Gal-1 in monocyte chemotaxis,<sup>43</sup> induced by its carbohydrate-binding function (which was reduced by 65% in the presence of lactose) and the MAP kinase pathways.<sup>51</sup> Additionally, administration of exogenous Gal-1 appears to play a role in the activation of these cells, particularly in dendritic cells by increasing the secretion of proinflammatory cytokines such as the chemokine MCP-1.<sup>52</sup>

Studies have demonstrated the importance of the adhesion molecules L-selectin (CD62L) and  $\beta$ 2-integrin (CD11b) in the transmigration of neutrophils to sites of injury, which are critical points in the host immune response.<sup>53</sup> Our investigation revealed a significant increase in the percentage of CD62L<sup>+</sup> neutrophils under acute inflammation (EIU 24 h) compared with control group, confirming the occurrence of

cell activation caused by LPS. However, at the same experimental time point, treatment with rGal-1 decreased the percentage of CD62L<sup>+</sup> neutrophils and increased that of CD11b<sup>+</sup> neutrophils, which was also found in the EIU 48 h group. In vitro experiments using human neutrophils activated by platelet PAF showed that Gal-1 has no effect on the expression of CD62L and CD11b at low concentrations (~2.75 to 27.5 nM), but is capable of inhibiting the capture and rolling of these cells at the endothelium.<sup>50</sup> However, at high concentrations (~275 nM), Gal-1 increases the adherence of neutrophils stimulated by PAF to the endothelium<sup>50</sup> and stimulates the chemotaxis of these cells.<sup>54</sup> In vivo investigations carried out in our laboratory have also demonstrated an association of the inhibitory role of exogenous Gal-1 in the transmigration of neutrophils with a significant increase in the expression of CD11b and CD62L at 4 hours (early acute inflammation) and 24 hours (resolution) after peritonitis was induced by zymosan,<sup>43</sup> respectively.

On the other hand, the anti-inflammatory role of Gal-1 can be reversed to become pro-inflammatory if the intraperitoneal administration of this lectin is performed without inflammatory stimuli in mice, leading to increases in the migration of peritoneal neutrophils and the percentage of CD11b<sup>+</sup> cells.<sup>54</sup> Thus, in our experimental model of uveitis, the inhibitory effect of Gal-1 on neutrophil recruitment may have occurred due to the low concentration of this lectin applied (3 µg/animal), which causes an imbalance in the expression of adhesion molecules on neutrophils and therefore negatively regulates cell transmigration at 24 hours.

Following the detection of the anti-inflammatory action of exogenous Gal-1, we examined its endogenous expression in the EIU model. Western blotting analysis revealed upregulation of endogenous Gal-1 in the eyes in the EIU 24 h group, which was confirmed via immunohistochemistry analysis of the anterior segment. In this region, Gal-1 was expressed at particularly high levels in the epithelial cells of the

cornea, conjunctiva, ciliary processes and iris as well as in endothelial cells. These results support the published finding that Gal-1 is expressed in the anterior segment of the human eye.<sup>55</sup> Modulation of this protein was also observed in a carrageenan-induced rat peritonitis model in which neutrophils show low levels of endogenous Gal-1 during early acute inflammation (4 hours) and high levels after 24 hours.<sup>32</sup> In addition, pharmacological treatment with rGal-1 induced a decrease of its endogenous expression in the anterior eye segment, most likely as a negative feedback mechanism.

In the posterior eye segment, expression of Gal-1 was also observed in the retina in all experimental groups, specifically in the ganglion cells, the inner and outer plexiform layers and the pigmented epithelium, indicating a structural function for this protein in this tissue. Pharmacological treatment with rGal-1 produced no significant change in the endogenous protein levels in relation to the EIU 24 h group. Similarly, some studies have demonstrated Gal-1 expression in human, bovine and rat retinas<sup>56, 57</sup> and suggested that this protein functions in the accession of the photoreceptors and the outer plexiform layer through interaction with specific glycoconjugates.<sup>56</sup> On the other hand there was a reduction in the expression of Gal-1 in the 48 h group that represents the resolution phase of inflammation in this model.<sup>8</sup> So, despite the Gal-1 can be considered a structural protein of the retinal it may also be secreted into the extracellular medium during the inflammatory process, indicating its anti-inflammatory action.

Based on the relevance of the phenotypic and functional characteristics of human ARPE-19 cells to inflammation<sup>58</sup> and to confirm the in vivo rodent data, we subsequently assessed Gal-1 expression in ARPE-19 cells activated by LPS and treated with rGal-1.

Transmission electron microscopy of ARPE-19 cells revealed Gal-1 immunoreactivity in the plasma membrane, cytosol and nucleus under different conditions. The activation of cells using LPS decreased the endogenous levels of Gal-1 at 2 and 24 hours compared to the control group, indicating the externalization of this protein during the inflammatory process and its participation in the physiology of control RPE cells. These data are also consistent with other studies that have demonstrated that the expression of Gal-1 in RPE cells is positively modulated during the process of cell differentiation and proliferation, particularly under the effect of hepatic growth factor (HGF).<sup>59</sup> In LPS-activated cells treated with Dex, increased expression of endogenous Gal-1 was detected after 24 hours compared with untreated cells, suggesting a role of the endogenous glucocorticoid in the regulation of this protein in a temporal manner. Previous investigations using nasal polyps<sup>60-62</sup> also demonstrated the upregulation of Gal-1 mRNA and protein following treatment with budesonide and betamethasone glucocorticoids, particularly in epithelial and connective tissues.

Further, the immunofluorescence analyses of COX-2 levels showed increased expression of this enzyme in the cytoplasm of ARPE-19 cells 24 hours after activation by LPS, confirming results from our laboratory.<sup>8</sup> However, ARPE-19 cells stimulated with LPS and treated with rGal-1 showed decreased levels of COX-2 expression.

Analyses of proinflammatory mediators in ARPE-19 cells revealed increased levels of IL-6 and IL-8 in LPS-activated cells after 24 hours compared with control cells. These data were consistent with findings from other studies in which the release of these inflammatory mediators was detected after LPS activation of ARPE-19 cells.<sup>2, 8, 58, 63</sup> However, treatment of the cells with Dex and rGal-1 was able to reduce the levels of IL-6 and IL-8 compared with the LPS 24 h group, supporting our in vivo data.



Altogether, our results indicated the involvement of Gal-1 in the resolution of ocular inflammation, both in vivo and in vitro, by inhibiting the release of proinflammatory mediators, leukocyte transmigration and changes in neutrophil subpopulations positive for CD62L and CD11b. Thus, Gal-1 represents a potential target for the treatment of inflammatory ocular conditions, especially uveitis.

### **Acknowledgments**

This study was supported by CNPq (476136/2011-3 and 302768/2010-6) and FAPESP (2011/21845-3). CF Zanon and NM Sonehara were supported by FAPESP scholarships (12/02759-1 and 11/05248-5). We thank Eloisa H. Tajara and Giovana M. Polachini from Laboratory of Molecular Biomarkers and Medical Bioinformatics, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), for assistance in the Western blotting analysis.

### **References**

1. Cai S, Brandt CR: Induction of interleukin-6 in human retinal epithelial cells by an attenuated Herpes simplex virus vector requires viral replication and NFkappaB activation. *Exp Eye Res* 2008, 86:178-88.
2. Leung KW, Barnstable CJ, Tombran-Tink J: Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling. *Mol Immunol* 2009, 46:1374-86.
3. Mochizuki M, Sugita S, Kamoi K: Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res* 2013, 33:10-27.
4. Mimura KK, Tedesco RC, Calabrese KS, Gil CD, Oliani SM: The involvement of anti-inflammatory protein, annexin A1, in ocular toxoplasmosis. *Mol Vis* 2012, 18:1583-93.
5. Brézin AP: [Uveitis]. *Presse Med* 2012, 41:10-20.
6. Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR: Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 1980, 286:611-3.
7. Chang JH, McCluskey P, Missotten T, Ferrante P, Jalaludin B, Lightman S: Use of ocular hypotensive prostaglandin analogues in patients with uveitis: does their use increase anterior uveitis and cystoid macular oedema? *Br J Ophthalmol* 2008, 92:916-21.
8. Girol AP, Mimura KK, Drewes CC, Bolonheis SM, Solito E, Farsky SH, Gil CD, Oliani SM: 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, 190:5689-701.

9. Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D: Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. *Br J Ophthalmol* 2006, 90:103-8.
10. Goureau O, Bellot J, Thillaye B, Courtois Y, de Kozak Y: Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Immunol* 1995, 154:6518-23.
11. Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, Kinoshita S, Namba K, Mizutani M, Fujikawa T, Itai A, Ohno S, Ishida S: Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an I $\kappa$ B kinase  $\beta$  inhibitor in rats. *Mol Vis* 2012, 18:2586-97.
12. Medeiros R, Rodrigues GB, Figueiredo CP, Rodrigues EB, Grumman A, Menezes-de-Lima O, Passos GF, Calixto JB: Molecular mechanisms of topical anti-inflammatory effects of lipoxin A(4) in endotoxin-induced uveitis. *Mol Pharmacol* 2008, 74:154-61.
13. Li S, Lu H, Hu X, Chen W, Xu Y, Wang J: Expression of TLR4-MyD88 and NF- $\kappa$ B in the iris during endotoxin-induced uveitis. *Mediators Inflamm* 2010, 2010:748218.
14. Kalariya NM, Reddy AB, Ansari NH, VanKuijk FJ, Ramana KV: Preventive effects of ethyl pyruvate on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, 52:5144-52.
15. Touchard E, Omri S, Naud MC, Berdugo M, Deloche C, Abadie C, Jonet L, Jeanny JC, Crisanti P, de Kozak Y, Combette JM, Behar-Cohen F: A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, 51:4683-93.
16. Srivastava A, Rajappa M, Kaur J: Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. *Clin Chim Acta* 2010, 411:1165-71.
17. Larson T, Nussenblatt RB, Sen HN: Emerging drugs for uveitis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2011, 16:309-22.
18. Rosenbaum JT: Future for biological therapy for uveitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2010, 21:473-7.
19. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG: Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl)* 1998, 76:402-12.
20. Rabinovich GA, Ariel A, Hershkovich R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O: Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 1999, 97:100-6.
21. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A: Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2000, 31:399-406.
22. Cooper D, Ilarregui JM, Pessoa SA, Croci DO, Perretti M, Rabinovich GA: Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. *Methods Enzymol* 2010, 480:199-244.
23. Cooper D, Iqbal AJ, Gittens BR, Cervone C, Perretti M: The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? *Ann N Y Acad Sci* 2012.
24. Cooper DN, Barondes SH: God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999, 9:979-84.
25. Liu FT, Rabinovich GA: Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1183:158-82.
26. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R: Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006, 16:137R-57R.
27. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, Griffioen AW:

- Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:15975-80.
28. Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG: Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 1999, 163:3801-11.
  29. Seropian IM, Cerliani JP, Toldo S, Van Tassell BW, Ilarregui JM, González GE, Matoso M, Salloum FN, Melchior R, Gelpi RJ, Stupirski JC, Benatar A, Gómez KA, Morales C, Abbate A, Rabinovich GA: Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 2013, 182:29-40.
  30. Toscano MA, Ilarregui JM, Bianco GA, Campagna L, Croci DO, Salatino M, Rabinovich GA: Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev* 2007, 18:57-71.
  31. Gil CD, Cooper D, Rosignoli G, Perretti M, Oliani SM: Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. *Inflamm Res* 2006, 55:99-107.
  32. Gil CD, La M, Perretti M, Oliani SM: Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. *Cell Biol Int* 2006, 30:338-44.
  33. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE: Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol* 1998, 160:4831-40.
  34. Blaser C, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H: Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 1998, 28:2311-9.
  35. Zúñiga E, Gruppi A, Hirabayashi J, Kasai KI, Rabinovich GA: Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. *Infect Immun* 2001, 69:6804-12.
  36. La M, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai K, Oliani SM, Chernajovsky Y, Perretti M: A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol* 2003, 163:1505-15.
  37. Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenbark AA: Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1990, 28:177-84.
  38. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y: Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 1999, 190:385-98.
  39. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, Hirabayashi J, Rizzo LV, Rabinovich GA: Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* 2006, 176:6323-32.
  40. Perone MJ, Bertera S, Tawadrous ZS, Shufesky WJ, Piganelli JD, Baum LG, Trucco M, Morelli AE: Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *J Immunol* 2006, 177:5278-89.
  41. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H: Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994, 269:20807-10.
  42. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG: Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol* 2000, 30:1331-9.

43. Gil CD, Gullo CE, Oliani SM: Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. *Int J Clin Exp Pathol* 2010, 4:74-84.
44. Iqbal AJ, Sampaio AL, Maione F, Greco KV, Niki T, Hirashima M, Perretti M, Cooper D: Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect. *Am J Pathol* 2011, 178:1201-9.
45. da Silva PS, Girol AP, Oliani SM: Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis* 2011, 17:1310-9.
46. Oliani SM, Perretti M: Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. *Ital J Anat Embryol* 2001, 106:69-77.
47. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM: ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 1996, 62:155-69.
48. Chang SW, Chou SF, Yu SY: Dexamethasone reduces mitomycin C-related inflammatory cytokine expression without inducing further cell death in corneal fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2010, 18:59-69.
49. Becker MD, Nobiling R, Planck SR, Rosenbaum JT: Digital video-imaging of leukocyte migration in the iris: intravital microscopy in a physiological model during the onset of endotoxin-induced uveitis. *J Immunol Methods* 2000, 240:23-37.
50. Cooper D, Norling LV, Perretti M: Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *J Leukoc Biol* 2008, 83:1459-66.
51. Malik RK, Ghurye RR, Lawrence-Watt DJ, Stewart HJ: Galectin-1 stimulates monocyte chemotaxis via the p44/42 MAP kinase pathway and a pertussis toxin-sensitive pathway. *Glycobiology* 2009, 19:1402-7.
52. Fulcher JA, Hashimi ST, Levroney EL, Pang M, Gurney KB, Baum LG, Lee B: Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. *J Immunol* 2006, 177:216-26.
53. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A: Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 2011, 118:6743-51.
54. Auvynet C, Moreno S, Melchy E, Coronado-Martínez I, Montiel JL, Aguilar-Delfin I, Rosenstein Y: Galectin-1 promotes human neutrophil migration. *Glycobiology* 2013, 23:32-42.
55. Fautsch MP, Silva AO, Johnson DH: Carbohydrate binding proteins galectin-1 and galectin-3 in human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 2003, 77:11-6.
56. Uehara F, Ohba N, Ozawa M: Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42:2164-72.
57. Romero MD, Muiño JC, Bianco GA, Ferrero M, Juarez CP, Luna JD, Rabinovich GA: Circulating anti-galectin-1 antibodies are associated with the severity of ocular disease in autoimmune and infectious uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, 47:1550-6.
58. Paimela T, Ryhänen T, Mannermaa E, Ojala J, Kalesnykas G, Salminen A, Kaarniranta K: The effect of 17beta-estradiol on IL-6 secretion and NF-kappaB DNA-binding activity in human retinal pigment epithelial cells. *Immunol Lett* 2007, 110:139-44.
59. Alge CS, Priglinger SG, Kook D, Schmid H, Haritoglou C, Welge-Lussen U, Kampik A: Galectin-1 influences migration of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, 47:415-26.
60. Delbrouck C, Doyen I, Belot N, Decaestecker C, Ghanooni R, de Lavareille A, Kaltner H, Choufani G, Danguy A, Vandenhoven G, Gabius HJ, Hassid S, Kiss R: Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Lab Invest* 2002, 82:147-58.

61. Fernandes AM, Babeto E, Rahal P, Provazzi PJ, Hidalgo CA, Anselmo-Lima WT: Expression of genes that encode the annexin-1 and galectin-1 proteins in nasal polyposis and their modulation by glucocorticoid. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010, 76:213-8.
62. Sena AA, Provazzi PJ, Fernandes AM, Cury PM, Rahal P, Oliani SM: Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. *Clin Exp Allergy* 2006, 36:1260-7.
63. Fodor M, Facskó A, Rajnavölgyi E, Hársfalvi J, Bessenyei E, Kardos L, Berta A: Enhanced release of IL-6 and IL-8 into tears in various anterior segment eye diseases. *Ophthalmic Res* 2006, 38:182-8.

**Table 1.** Quantitative analysis of neutrophils (Nøs) and mononuclear phagocytic cells (Mono-Møs) in aqueous humor and blood.

Groups	AqH (cells x 10 <sup>5</sup> /mL)		Blood (cells x10 <sup>3</sup> /mL)	
	Nøs	Mono-Møs	Nøs	Mono-Møs
Control	6.2 ± 0.78	0.8 ± 0.24	2457 ± 606.5	3,57.1 ± 147.8
EIU 24 h	48.1 ± 8.42	6.0 ± 1.12 **	11863 ± 2689	728.6 ± 242.5
	**		***	
EIU 48 h	18.7 ± 2.33 †	1.85 ± 0.51 †	2620 ± 1268 ††	950 ± 297.0 †
EIU+rGal-1 24 h	16.85 ± 9.97 †	20.53 ± 2.14 †††	2470 ± 687.1 †††	1850 ± 117.3 ***
	†	***		

Data represent the mean ± S.E.M. of the number of cells in the aqueous humor (AqH) and the in the blood (n = 5 animals/group). \*\*P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 versus control; †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001 versus EIU 24 h.

**Table 2.** Effect of rGal-1 on the release of soluble mediators in EIU.

Groups	Cytokines (pg/mL)		
	MCP-1	IL-1 $\beta$	IL-6
Control	2.35 $\pm$ 1.66	117.4 $\pm$ 14.23	112.8 $\pm$ 5.82
EIU 24 h	157.8 $\pm$ 33.46 **	413.8 $\pm$ 54.5 ***	139.7 $\pm$ 5.26 *
EIU 48 h	0.74 $\pm$ 0.30 ††	179 $\pm$ 21.38 †††	118.3 $\pm$ 3.77 †
EIU + rGal-1 24 h	70.02 $\pm$ 20.12 *	273.5 $\pm$ 25.32 †	108.1 $\pm$ 4.60 ††

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of the protein concentration (pg/mL) (n = 5 animals/group). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 versus control; †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001 versus EIU 24 h.

**Table 3.** Effect of rGal-1 on soluble mediator release on ARPE-19 cells.

Groups	Cytokines (pg/mL)	
	IL-6	IL-8
Control	99.62 $\pm$ 10.25	185.5 $\pm$ 2.48
LPS	431 $\pm$ 66.38 **	361 $\pm$ 3.65 ***
LPS + rGal-1 0.04	210.2 $\pm$ 5.55	270.9 $\pm$ 18.33 ** ††
LPS + rGal-1 0.4	113.4 $\pm$ 2.38 ††	100.1 $\pm$ 2.711 ** †††
LPS + rGal-1 4.0	89.52 $\pm$ 53.09 ††	73.19 $\pm$ 19.25 ** †††
LPS + Dex	114.8 $\pm$ 11.68 ††	78.86 $\pm$ 6.22 ** †††
Dex	60.53 $\pm$ 14.53 ††	65.48 $\pm$ 8.74 ** †††

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from the supernatants. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 versus control, †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001 versus LPS.

---

**Figure captions**

**Figure 1.** Histopathological analysis of ocular tissues in EIU. **A–C:** Absence of leukocytes in control ocular tissues. **D–F:** Influx of neutrophils (arrows) in the ciliary processes, limbus and retina 24 hours after the induction of uveitis by LPS (EIU 24 h). **G–L:** Decreased cell extravasation 48 hours after the induction of uveitis (EIU48 h) and **J–L:** after treatment with rGal-1. Sections: 1 mm. Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ . **M–N:** Quantitative analysis of neutrophils in the anterior and posterior segments of the eye. The data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of the number of neutrophils/ $\text{mm}^2$  (n = 5 animals/group). \*\*\*P<0.001 versus control; ††P <0.01, †††P <0.001 versus EIU 24 h.

**Figure 2.** Expression of L-selectin (CD62L) and  $\beta 2$ -integrin (CD11b) on circulating leukocytes detected via flow cytometry. Cells were labeled with antibodies specific for the surface adhesion molecules CD62L (conjugated with PE) and CD11b (conjugated with FITC). **A–D:** Representative dot plots of leukocytes (each point represents a cell) immunostained for adhesion molecules. **A:** Control group, **B:** EIU 24 h, **C:** EIU 48 h, and **D:** treated with rGal-1 after EIU 24 h. **E:** Unlabeled cells (negative control). **F:** Percentages of CD62L<sup>+</sup>, **G:** CD11b<sup>+</sup> and **H:** CD62L<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> neutrophils. Data represent the median  $\pm$  S.E.M. of the percentage of cells. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 versus control; †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P <0.001 versus EIU 24 h.

**Figure 3.** Gal-1 expression in the anterior eye segment. **A:** Gal-1 immunoreactivity in the epithelial cells of the cornea, **B:** ciliary body and **C:** iris in the control group. **D–F:** EIU 24 h: intense immunostaining in the epithelium. **G–I:** EIU 48 h and **J–K:** EIU 24 h groups treated with rGal-1, showing diminished Gal-1 expression in epithelial cells. **L:** Control section. Counterstaining: hematoxylin. Bars: 20  $\mu\text{m}$ . **M:** Densitometric

---

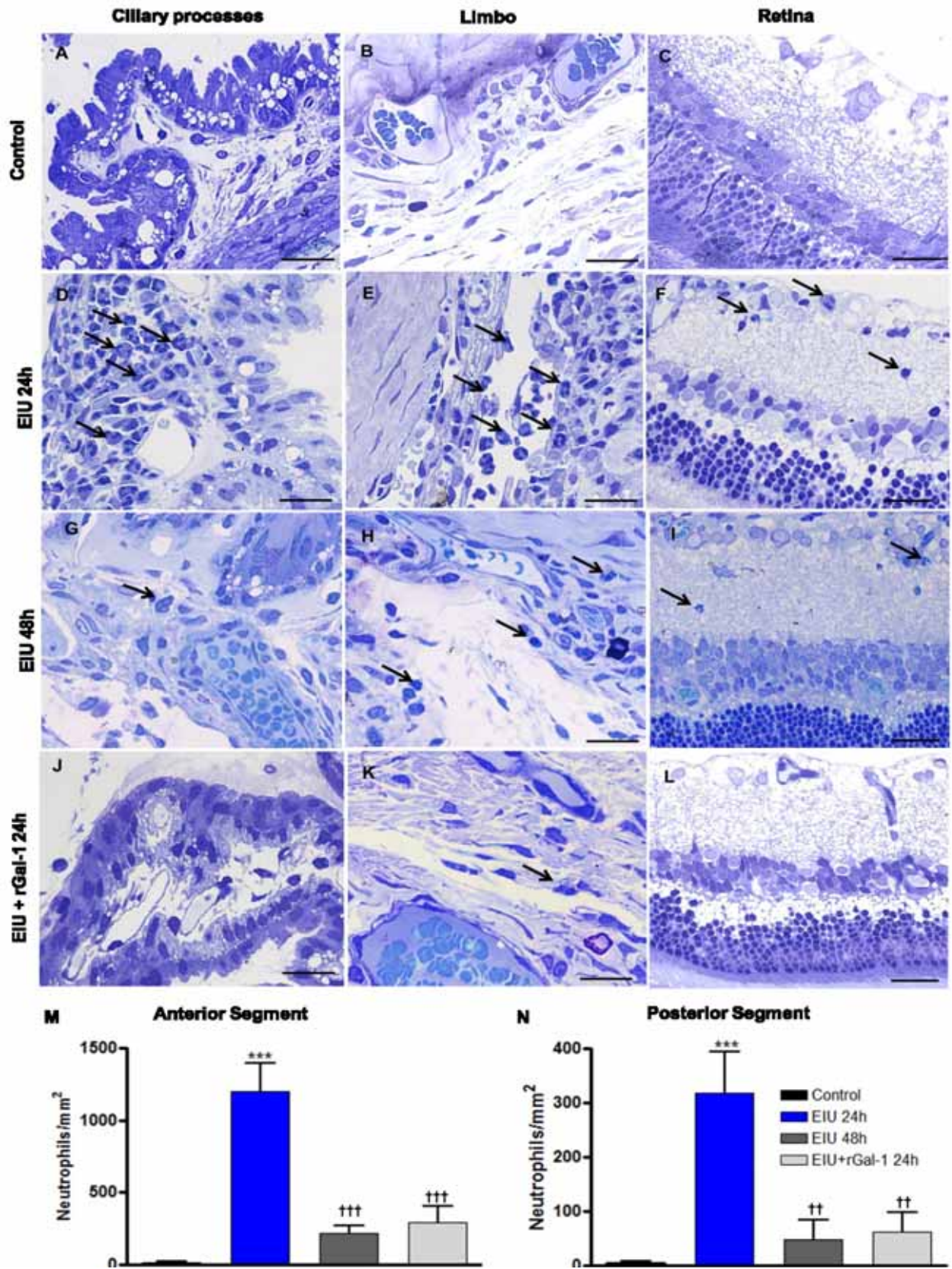
analysis of Gal-1 expression in epithelial cells. Values (arbitrary units) are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of sections analyzed ( $n= 5$  rats/ group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus. control; ††† $P < 0.001$  vs. EIU 24 h.

**Figure 4.** Gal-1 expression in eye supernatants. **A:** Representative Western blot illustrating Gal-1 expression in rats. Equal loading was confirmed using anti- $\beta$ -actin. **B:** Immunoreactive protein bands were semiquantified via densitometry and expressed in arbitrary units (a.u.) relative to  $\beta$ -actin. Data are expressed as the means  $\pm$  SEM.  $n = 5$  rats per group. \* $P < 0.05$  versus control.

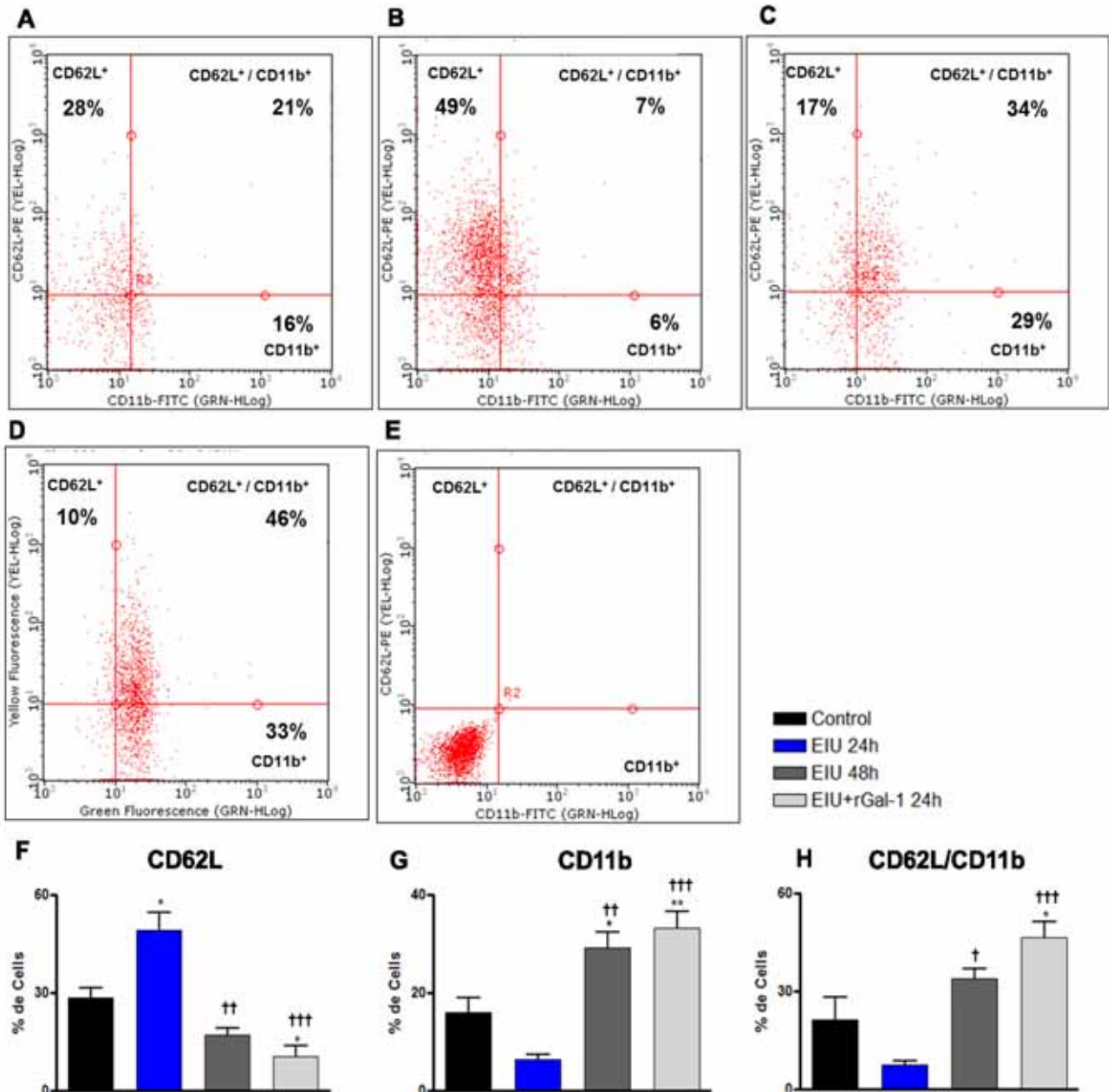
**Figure 5.** Gal-1 expression in the rat posterior eye segment and ARPE-19 cells. **A-D:** The inner and external plexiform layers, ganglion cells and retinal pigment epithelium (RPE) were positive for Gal-1. **E:** No immunostaining was detected in the control section. Counterstain: hematoxylin. Bars: 20  $\mu\text{m}$ . **F:** Densitometric analysis of the posterior segment immunostained for Gal-1. Values (arbitrary units) are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of sections analyzed from 5 rats/group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus control; † $P < 0.05$ , ††† $P < 0.001$  versus EIU 24 h. **G-K:** Electron micrograph of ARPE-19 cells showing immunogold particles (15 nm) in the plasma membrane (arrowhead), cytosol (arrows) and nucleus (N) of cells under different conditions. **G:** Control. **H-I:** LPS-stimulated cells at 24 and 48 hours. **J:** LPS-stimulated cells treated with Dex. **K:** Absence of gold labeling in sections incubated with nonimmune goat anti-rabbit serum. Bars: 0.5  $\mu\text{m}$ . **L:** Density of Gal-1 immunogold particles. Data are the mean  $\pm$  SEM of gold particles per  $\mu\text{m}^2$ . \* $P < 0.05$  versus. control; † $P < 0.05$  vs. LPS 24 h.



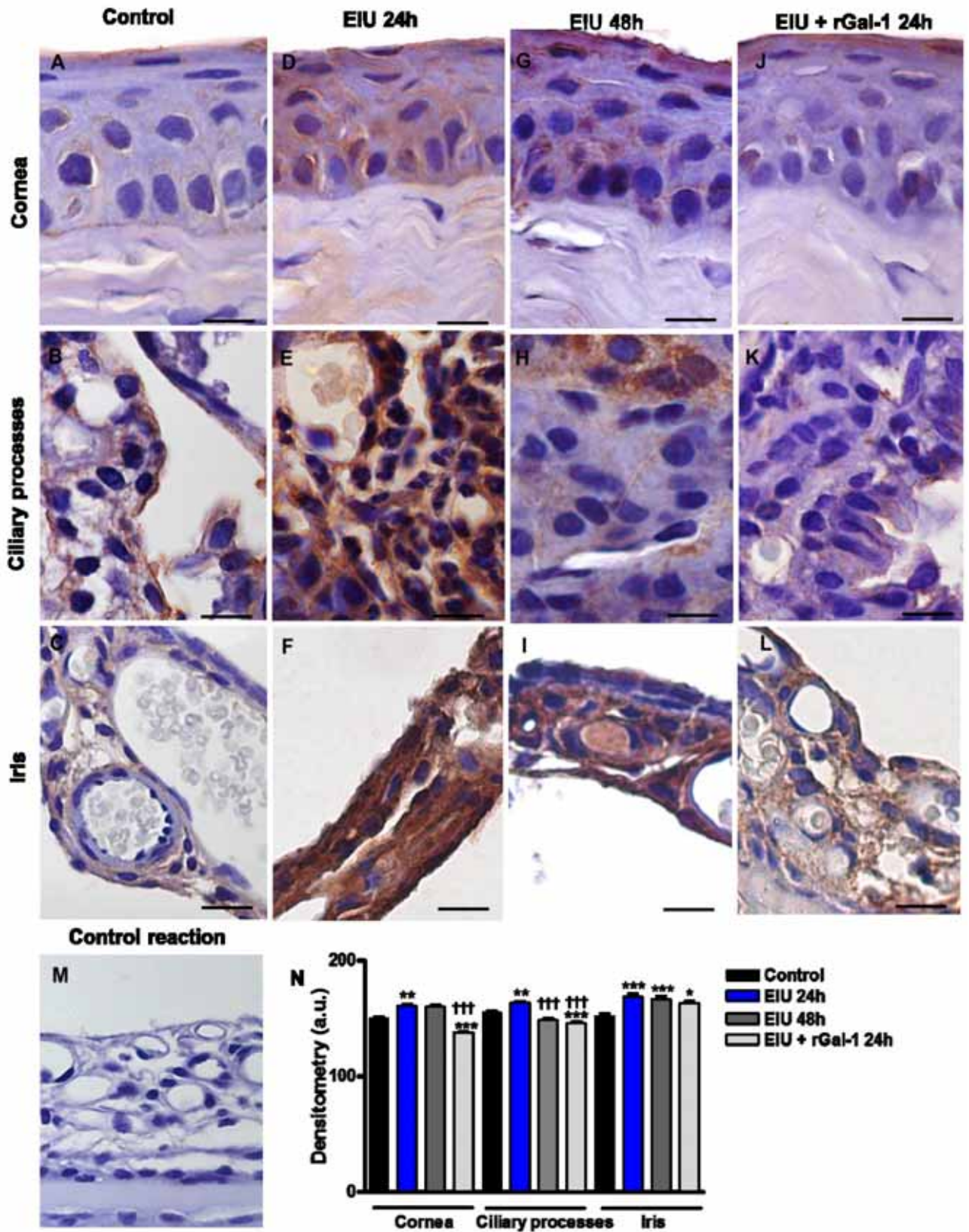
**Figure 6.** COX-2 immunofluorescence in ARPE-19 cells. **A:** Control cells. **B:** LPS-activated cells exhibited predominantly cytoplasmic expression. **C:** LPS/rGal-1 cells (4 µg/mL) showed decreased COX-2 immunoreactivity in the cytoplasm and **D:** LPS/Dex in this compartment and nucleus. Bars: 10 µm. **E:** Densitometric analysis of COX-2. The data are presented as the mean ± S.E.M. of the densitometric index (arbitrary units – a.u.) of cells from three independent experiments. \*\*\*P < 0.001 versus control; †††P < 0.001 vs. LPS.



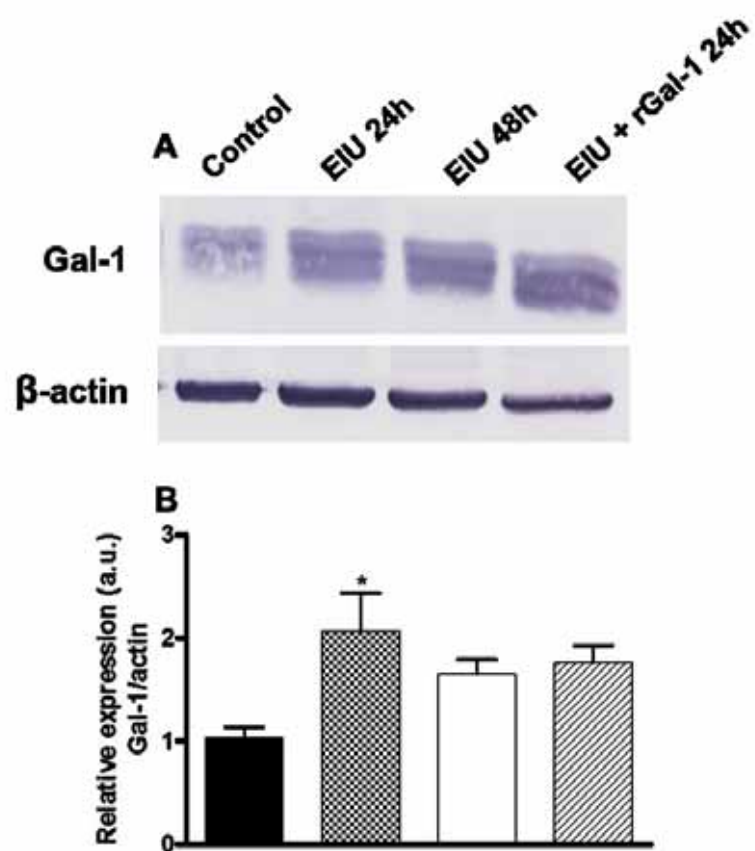
ZANON, SONEHARA et al. Figure 1



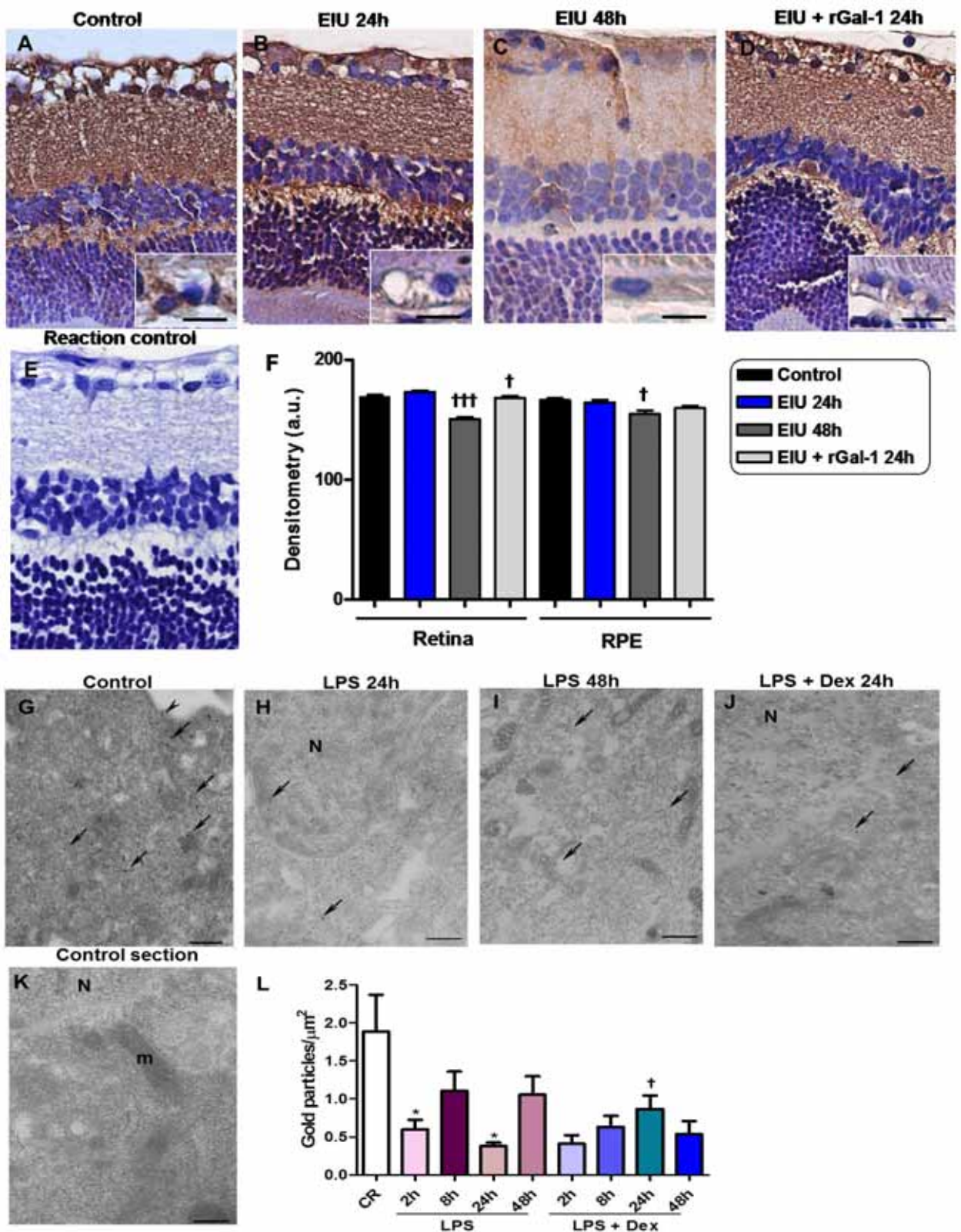
ZANON, SONEHARA et al. Figure 2



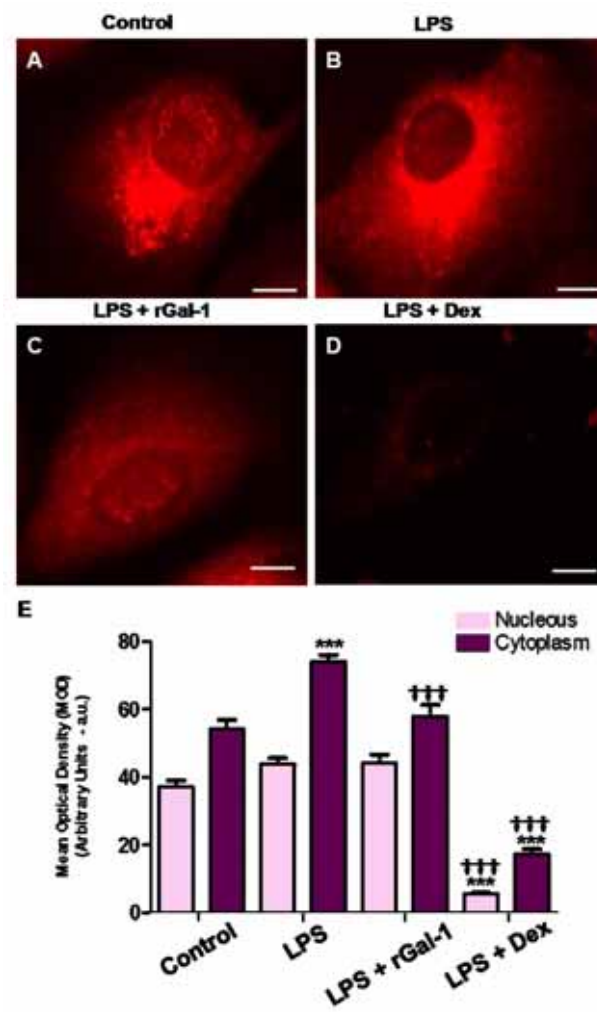
ZANON, SONEHARA et al. Figure 3



ZANON, SONEHARA et al. Figure 4



ZANON, SONEHARA et al. Figure 5



ZANON, SONEHARA et al. Figure 6

**ANEXO**

---



**Aprovação do Comitê de Ética sobre Experimentação Animal (CEE)**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
IBILCE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da Expressão da Proteína Anti-inflamatória Galectina-1 em Modelo de Uveíte Induzida por Lipopolissacarídeo**" (protocolo no. 015/09 CEEA), sob responsabilidade de Sonia Maria Oliani, está de acordo com os Princípios Éticas na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, em reunião de 15/05/2009.

CERTIFICATE

UNESP / IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEEA) hereby certify that the scientific investigation entitled "**Study of Expression of Anti-inflammatory Protein Galectin-1 in Uveitis Model Induced by lipopolysaccharide**" (protocol n. 015/09 CEEA), on Sonia Maria Oliani responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on Mai 15<sup>th</sup>, 2009.

São José do Rio Preto, 19 de maio de 2009.

  
Prof. Dra. Rejane Maira Góes  
Presidente da CEEA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Departamento de Biologia.  
Rua Cristóvão Colombo, 2265 CEP 15054-000 São José do Rio Preto - SP - Brasil  
Tel 17 221 2429 fax 17 221 2390  
E-mail:ceea@ibilce.unesp.br