



Cláudia Bosnic Mello Bochi

Modelo Experimental de Conjuntivite Alérgica: efeito do tratamento  
farmacológico com a proteína anti-inflamatória galectina -1

São José do Rio Preto  
2014

Cláudia Bosnic Mello Bochi

Modelo Experimental de Conjuntivite Alérgica: efeito do tratamento  
farmacológico com a proteína anti-inflamatória galectina - 1

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, 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>.Cristiane Damas Gil

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto  
2014

Mello-Bochi, Cláudia Bosnic.

Modelo experimental de conjuntivite alérgica : efeito do tratamento farmacológico com a proteína anti-inflamatória galectina - 1 / Cláudia Bosnic Mello Bochi. -- São José do Rio Preto, 2014  
106 f. : il.

Orientador: Cristiane Damas Gil

Coorientador: Sonia Maria Oliani

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. Conjuntivite alérgica. 5. Olhos - Inflamação. 6. Agentes anti-inflamatórios.  
7. Imuno-histoquímica. I. Gil, Cristiane Damas. II. Oliani, Sonia Maria.  
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Cláudia Bosnic Mello Bochi

Modelo Experimental de Conjuntivite Alérgica: efeito do tratamento  
farmacológico com a proteína anti-inflamatória galectina - 1

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, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Damas Gil  
EPM/UNIFESP – São Paulo  
Orientador

Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith  
EPM/UNIFESP – São Paulo

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Maluf Cury  
FACERES – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
25 de fevereiro de 2014

*Dedico esse trabalho aos meus pais,  
que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade,  
que iluminaram meus caminhos obscuros com afeto e  
dedicação,  
que me ensinaram a ser perseverante e ter esperanças,  
que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos,  
para que pudesse realizar o meu.  
A vocês, não bastaria dizer muito obrigado,  
não tenho palavras para agradecer,  
mas é o que nos acontece agora, quando procuramos  
arduamente  
uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar.  
Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.  
Amo vocês!*

*À professora Doutora Cristiane Damas Gil,  
pessoa e profissional extraordinária, pela  
confiança, disponibilidade, paciência e  
entusiasmo, assim e com sua competente  
direção e perspicácia proporcionou a  
realização desse trabalho.*

*À professora Doutora Sonia Maria Oilani,  
exemplo de profissionalismo e dedicação,  
pessoa ímpar que tenho grande admiração e  
respeito, pela oportunidade e pela sua  
enriquecedora contribuição em todas as  
etapas do desenvolvimento desse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

*A presente dissertação representa o culminar de toda minha vida profissional e pessoal. Gostaria de agradecer a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão do trabalho apresentado.*

*Agradeço primeiramente à Deus por ter me proporcionados condições físicas e psíquicas para que eu pudesse desenvolver e finalizar esse meu trabalho.*

*Aos meus pais, Francisca e Prof. Dr. Mello, os maiores exemplos da minha vida e que sempre confiaram em meus sonhos e me encorajaram a realizá-los.*

*Ao meu filho, Cesar Augusto, por existir, por estar sempre presente, por iluminar os meus dias, por transmitir a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir, e por ser a razão da minha vida. Essa vitória também é sua meu filho!*

*À minhas irmãs e toda minha família que mesmo de longe sempre me apoiaram.*

*À Caroline Zanon, Kallyne Mimura, Janesly Prates, Alexandre Dantas Gimenes, Laila Toniol Cardin, Lucas Ribeiro de Azevedo companheiros sempre prontos e dispostos a me auxiliar.*

*Aos valiosos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE: Ayla Blanco, Gabriela Franco, Carla Patrícia Carlos, Ana Paula Girol, Nathália Martins Sonehara, Jéssica Zani Lacerda, Marina de Paula Silva, Aline Camargo Miranda, Marystela Fávero Oliveira, Rafaela Molás, Andréia Rodrigues de Moraes, Rubens de Paula Junior, Analice Andreoli da Silva, Cristina Ribeiro Mendes e Maysa Succi Domingues.*

*À Universidade Federal de Medicina de São Paulo (UNIFESP) em especial ao Departamento de Morfologia e Genética, pela permissão do uso de suas dependências durante a realização desse trabalho.*

*As alunas Teresa Raquel de Moraes Andrade, Lisandra Ramos e Wu Meng Chieh do laboratório de Biologia Estrutural e Funcional morfologia da UNIFESP-SP, pela dedicação, amizade e inestimáveis colaborações, durante várias etapas do trabalho.*



## RESUMO

**Introdução:** A conjuntivite alérgica (CA) representa uma doença complexa do sistema imune envolvendo desgranulação dos mastócitos na conjuntiva e liberação de mediadores que provocam o influxo de células inflamatórias nessa membrana mucosa. Entre os mediadores anti-inflamatórios, destacamos a proteína galectina-1 (Gal-1) capaz de controlar o processo de transmigração dos leucócitos, liberação de citocinas e desgranulação de mastócitos. Contudo, seu papel nas inflamações oculares tem sido pouco estudado. **Métodos:** Nos dias 0 e 7, camundongos machos Balb/c receberam a administração via subcutânea de ovalbumina (OVA; 5 $\mu$ g) e, nos dias 14, 15 e 16 foram desafiados com OVA (250 $\mu$ g) por instilação direta no saco conjuntival. Para os tratamentos farmacológicos (dias 14-16), foram administrados intraperitonealmente Gal-1 recombinante (rGal-1; 0,3  $\mu$ g/animal) ou dexametasona (Dex; 1 mg/kg). O escore clínico foi realizado 20 minutos após o desafio. Após 4 e 24 horas do último desafio, os animais foram sacrificados e as análises realizadas por meio de: histopatologia e quantificação de células inflamatórias na conjuntiva bulbar e sangue; dosagem dos níveis de IgE anti OVA no plasma pela técnica de ELISA; dosagens das citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e quimiocinas (RANTES, MCP-1 e eotaxina) nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos, por meio de painel multiplex e, imuno-histoquímica para detectar a expressão da Gal-1 na conjuntiva. **Resultados:** A CA foi caracterizada pelo aumento significativo do escore, principalmnte no 16º dia ( $5,7 \pm 0,3$ ;  $P < 0,001$ ) comparado ao controle ( $2,6 \pm 0,6$ ), seguido de nível elevado de IgE anti-OVA após 4 e 24h. Os tratamentos farmacológicos com rGal-1 ( $1,2 \pm 0,5$ ;  $P < 0,001$ ) e Dex ( $3,0 \pm 0,2$ ;  $P < 0,05$ ) diminuíram os sinais clínicos, e rGal-1 reduziu o nível de IgE anti-OVA ( $28,6 \pm 6,3$ ;  $P < 0,05$ ), comparado ao grupo CA ( $70 \pm 12,8A$ ). As análises histopatológicas e quantitativas de células inflamatórias mostraram aumento significativo de mastócitos, neutrófilos circulantes e transmigrados para a conjuntiva após 4 e 24h. Na fase tardia (24h), influxo significativo de eosinófilos também foi observado na conjuntiva do grupo CA. A administração de rGal-1 aumentou monócitos circulantes, após 4h, e reduziu o número de mastócitos nesse período e após 24h em relação ao grupo CA. Por outro lado, essa lectina causou influxo significativo de

eosinófilos para a conjuntiva, especialmente na fase inicial, acompanhada de redução no sangue. A ação anti-inflamatória de Dex reduziu significativamente o número de eosinófilos na conjuntiva, após 24h, em relação aos animais CA. A avaliação das citocinas demonstrou que os tratamentos farmacológicos com rGal-1 e Dex diminuíram significativamente a produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) no fluido lacrimal, Th2 (IL-4 e IL-13) e eotaxina nos linfonodos comparados ao grupo CA. A administração de rGal-1 mostrou efeito antagônico nos olhos, inibindo IL-2 e aumentando IL-4. A expressão endógena da Gal-1 foi detectada no epitélio e lâmina própria da conjuntiva bulbar em todas as condições experimentais. Após 4h, a CA foi associada com diminuição significativa de sua expressão na lâmina própria, seguida por aumento no epitélio, após 24h. Nesse período fase, o tratamento com Dex modulou positivamente o nível de Gal-1 no epitélio e lâmina própria. Já a administração de rGal-1 aumentou sua expressão endógena no epitélio e lâmina própria na fase inicial e, após 24h, diminuição significativa nesses dois compartimentos. **Conclusão:** Os dados mostram a participação da Gal-1 na resposta alérgica por meio da regulação do recrutamento de células inflamatórias, liberação de citocinas/quimiocinas e de sua expressão endógena, representando um alvo potencial para novas estratégias terapêuticas nas inflamações oculares.

Palavras-chave: citocinas, conjuntivite alérgica, galectina-1, imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Allergic conjunctivitis (AC) is a complex disease of the immune system which includes mast cell degranulation in the conjunctiva and release of mediators that trigger inflammatory cell infiltration in this mucous membrane. Among the anti-inflammatory mediators, we highlight the protein galectin-1 (Gal-1) which regulates the process of leukocyte transmigration, release of cytokines and mast cell degranulation. However, its role in ocular inflammation has been little studied. **Methods:** BALB/c male mice were sensitized subcutaneously with 5 $\mu$ g of ovalbumin (OVA) on days 0 and 7 and challenged by eye drops containing OVA (250  $\mu$ g) once daily (days 14, 15 and 16). For pharmacological treatment (days 14-16) animals received intraperitoneally recombinant Gal-1 (rGal-1; 0.3  $\mu$ g /animal) or dexamethasone (Dex; 1 mg/kg). The clinical score was performed twenty minutes after OVA challenge (days 14-16). After 4 and 24 hours of last OVA challenge, the animals were sacrificed and the followed analyses were performed: histopathology and quantification of inflammatory cells in the bulbar conjunctiva and blood; plasma anti-OVA IgE levels by ELISA; cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) and chemokines (RANTES, MCP-1 and eotaxin) levels in the eyes, lacrimal fluid and lymph nodes by multiplex panel; and immunohistochemistry to detect Gal-1 expression in the conjunctiva. **Results:** The CA was characterized by a significant increase in the score, especially on the 16th day ( $5.7 \pm 0.3$ ,  $P < 0.001$ ) compared with controls ( $2.6 \pm 0.6$ ), followed by high anti-OVA IgE levels after 4 and 24h. Pharmacological treatments with rGal-1 ( $1.2 \pm 0.5$ ,  $P < 0.001$ ) and Dex ( $3.0 \pm 0.2$ ,  $P < 0.05$ ) decreased the clinical signs and rGal-1 reduced anti-IgE OVA levels ( $28.6 \pm 6.3$ ,  $P < 0.05$ ), compared to the CA group ( $70 \pm 12.8$ ). Histopathological and quantitative analysis of inflammatory cells presented a significant increase of mast cells, intravascular and transmigrated neutrophils in the conjunctiva after 4 and 24h. In the late phase (24h), a significant influx of eosinophils was also observed in the conjunctiva of the AC group. Administration of rGal-1 increased the circulating monocytes after 4h, and reduced the number of mast cells in this time-point and 24h compared to the AC group. On the other hand, this lectin caused a significant influx of eosinophils into the conjunctiva, especially in the initial phase, followed by reduction of these circulating cells. The anti-inflammatory action of Dex significantly decreased the number of eosinophils in the conjunctiva, after 24h, compared to the AC animals. The cytokine evaluation evidenced that the pharmacological treatments with rGal-1 and Dex significantly decreased the production of Th1 (IFN- $\gamma$ ) in the lacrimal fluid, Th2 (IL-4 and IL-13) and eotaxin in the lymph nodes compared to the AC group. Administration of rGal-1 revealed an antagonistic effect in the eye by inhibiting IL-2 and increasing IL-4. The endogenous expression of Gal-1 was detected in the epithelium and lamina propria of the bulbar conjunctiva on all experimental conditions. After 4h, the AC was associated with significant reduction of its expression in the

*lamina propria, followed by an increase in the epithelium, after 24h. The treatment with Dex positively modulated the level of Gal-1 in epithelium and lamina propria, particularly in the late phase. Administration of rGal-1 increased its endogenous expression in the epithelium and lamina propria in the initial phase, and subsequently a significant decrease in these two compartments in the late phase. **Conclusion:** Our data point out the involvement of Gal-1 in the allergic response by regulating the recruitment of inflammatory cells, the release of cytokines/chemokines and its endogenous expression, representing a potential target for novel therapeutic strategies in ocular inflammations.*

*Keywords: cytokines, allergic conjunctivitis, galectin-1, immunohistochemistry.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Histologia do segmento anterior do globo ocular.....	17
Figura 2	Anatomia da conjuntiva.....	18
Figura 3	Controle da resposta por IgE mediado por citocinas.....	20
Figura 4	Subdivisão das galectinas baseada em sua organização estrutural.....	25
Figura 5	Protocolo experimental para indução da CA em camundongos .....	31
Figura 6	Esquema de processamento das amostras coletadas para cada grupo experimental..	32
Figura 7	Avaliação dos olhos dos animais após 20 minutos da instilação de ovalbumina nos dias 14, 15 e 16.....	38
Figura 8	Dosagem de IgE anti-OVA.....	39
Figura 9	Quantificação dos leucócitos no sangue.....	40
Figura 10	Análise histopatológica da conjuntiva bulbar.....	42
Figura 11	Mastócitos na conjuntiva bulbar.....	43
Figura 12	Quantificação de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos na conjuntiva bulbar.....	44
Figura 13	Dosagem das citocinas de perfil Th1 nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos.....	47
Figura 14	Dosagem das citocinas de perfil Th2 nos olhos, fluido lacrimal.....	48
Figura 15	Dosagem das citocinas de perfil Th2 nos linfonodos.....	49
Figura 16	Dosagem das quimiocinas nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos.....	50
Figura 17	Expressão da proteína Gal-1 endógena na conjuntiva bulbar.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação clínica da conjuntivite.....	33
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$ : microlitro

$\mu\text{M}$ : micromolar

$\mu\text{g}$ : micrograma

pg: picograma

ANOVA: análise de variância

APCs: células apresentadoras de antígenos

ALUM: adjuvante hidróxido de alumínio

BSA: soro de albumina bovina

CA: conjuntivite alérgica

CCL: quimiocina da subfamília CC (cisteína-cisteína)

CCR: receptor da quimiocina CC

CRD: domínio reconhecedor de carboidratos

CSF: fatores estimuladores de colônia

DAB: 3,3' - diaminobenzidina

DEX: dexametasona

ECP: proteína eosinofílica catiônica

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

Fc $\epsilon$ RI: receptor de IgE de alta afinidade

Gal-1: galectina-1

rGal-1: galectina-1 recombinante

GC: glicocorticoide

IFN- $\gamma$ : interferon gama

IgE: imunoglobulina E

ICAM-1: moléculas de adesão intercelular 1

IL: interleucina

i.p.: intraperitonal

kDa: kilodalton

LPS: lipopolissacarídeo

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos

RANTES: quimiocina regulada após ativação das células T normalmente expressa e secretada

Kg: quilograma

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

NaCl: cloreto de sódio

ng: nanograma

OVA: ovalbumina

PBS: tampão fosfato-salino ( phosphate buffered saline)

rpm: rotação por minuto

s.c.: subcutânea

S.E.M: erro padrão da média

TGF- $\alpha$ : fator de crescimento transformante alfa

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante beta

Th1: linfócito T auxiliar do tipo 1

Th2: linfócito T auxiliar do tipo 2

TNF- $\alpha$ : fator alfa de necrose tumoral

Triton-x: polietileno-glicol p-éter (1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil

Tris-HCl: cloridrato hidroximetil aminometano

VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1



## SUMÁRIO

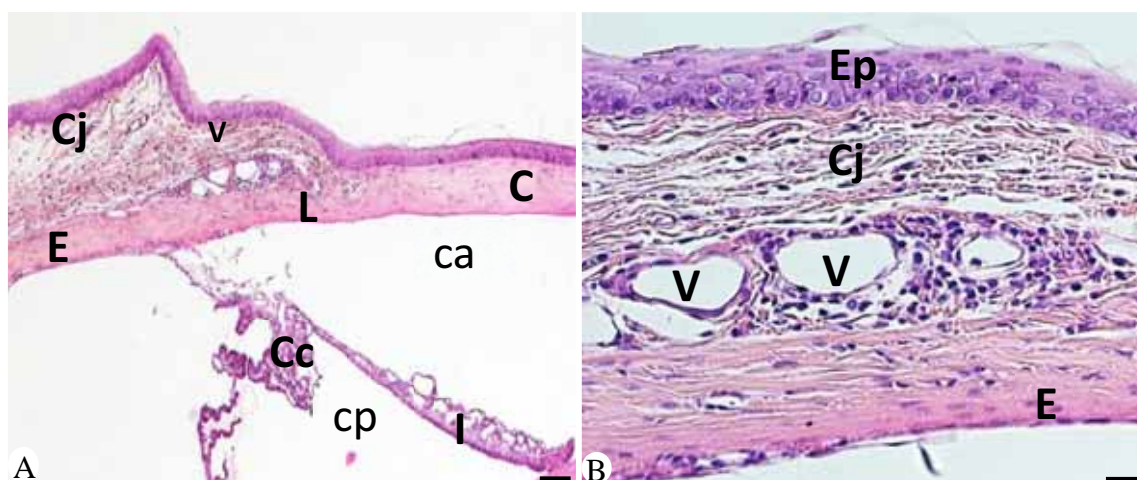
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. O Globo Ocular e a Conjuntiva.....	17
1.1. Conjuntivite Alérgica.....	18
1.3. Processo Inflamatório Alérgico: ativação de células imunes e produção de mediadores.....	20
1.4. Galectina-1.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Modelo experimental de conjuntivite alérgica e protocolos de tratamentos farmacológicos.....	30
3.3. Escore clínico.....	32
3.4. Análises histopatológicas e quantificação das células inflamatórias.....	33
3.4.1. Olhos.....	33
3.4.2. Sangue periférico.....	33
3.5. Imuno-histoquímica.....	34
3.6. Análise dos níveis de IgE anti-OVA por ELISA.....	35
3.7. Análise dos níveis de citocinas e quimiocinas por painel multiplex.....	35
3.8. Análises estatísticas.....	36
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Escore clínico.....	38
4.2. Efeito do tratamento farmacológico com rGal-1 nos níveis de IgE anti-OVA.....	39
4.3. Quantificação de leucócitos circulantes e efeito do tratamento farmacológico com a proteína rGal-1.....	39
4.4. Histopatologia: resposta inflamatória alérgica na conjuntiva bulbar e efeito do tratamento farmacológico com a proteína rGal-1 recombinante.....	41
4.5. Quantificação dos níveis de citocinas e quimiocinas.....	45
4.6. Expressão da proteína Gal-1 na conjuntiva bulbar.....	51
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	65
8. APÊNDICE A – Immunomodulatory effects of galectin-1 on IgE-mediated allergic conjunctivitis model.....	73



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Globo Ocular e a Conjuntiva

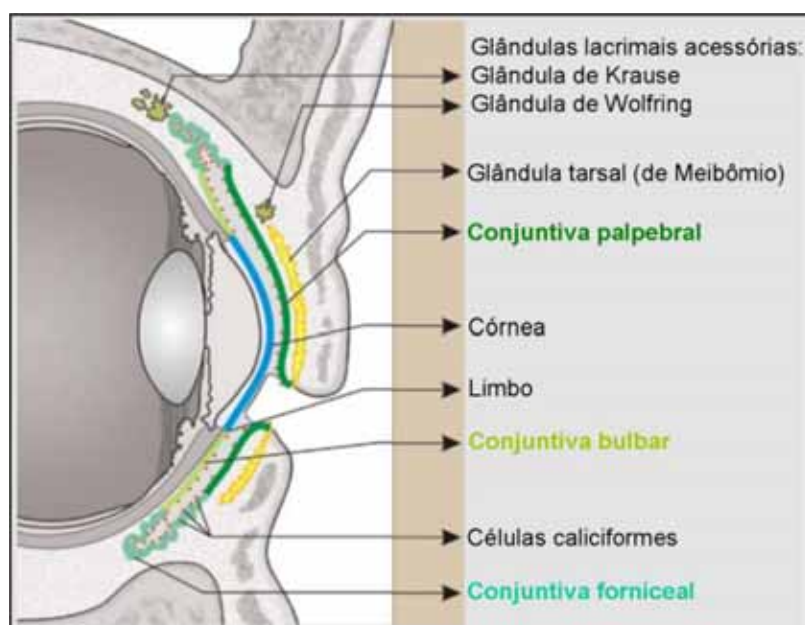
Histologicamente, o globo ocular do camundongo apresenta três túnicas concêntricas que revestem os segmentos anterior e posterior do olho. A túnica mais externa ou corneoescleral é constituída pela córnea, limbo e esclera, seguida pela túnica vascular ou úvea, composta pela corioide, íris e corpo ciliar (Figura 1A), e mais internamente, a retina. Essas túnicas delimitam três câmaras distintas e interconectadas, localizadas nos segmentos anterior e posterior do olho. No segmento anterior, observamos as câmaras anterior, espaço entre a córnea e a superfície anterior da íris, e posterior, região entre a íris e a lente (Figura 1A). Essas duas câmaras são preenchidas pelo humor aquoso, fluido de composição iônica semelhante ao plasma e produzido pelas células epiteliais do corpo ciliar. No segmento posterior observamos a câmara vítrea, localizada atrás da lente, circundada pela retina e preenchida pelo corpo vítreo, substância gelatinosa transparente.



**Figura 1. Histologia do segmento anterior do globo ocular.** [A] Visão panorâmica das camadas externa e vascular do olho e conjuntiva bulbar (cj). Córnea (C), limbo (L) e esclera (E) constituem a túnica mais externa do olho. Corpo ciliar (Cc) e íris (I) constituem a túnica vascular. Câmaras anterior (ca) e posterior (cp). [B] Detalhe da figura anterior, evidenciando a conjuntiva bulbar formada por epitélio pavimentoso (Ep) e lâmina própria (cj) rica em vasos sanguíneos (V). Esclera (E). Cortes de 4µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: (A) 50µm; (B) 20 µm.

A conjuntiva, estrutura acessória do globo ocular, é uma membrana mucosa fina transparente. Anatomicamente, essa membrana está localizada na margem periférica da córnea, através da esclera (conjuntiva bulbar), fórnix do saco lacrimal (conjuntiva forniceal) e superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral) (Figura 2)

(PAULSEN; BERRY, 2006; ROSS; PAWLINA, 2012). A conjuntiva bulbar, nos camundongos, apresenta epitélio estratificado formado por 2 a 8 camadas de células com forma cilíndrica a pavimentosa, dependendo de sua localização, sustentado pela lâmina própria composta de tecido conjuntivo frouxo (Figura 1B). No epitélio podem ser observadas também células caliciformes, cuja secreção compõe o filme lacrimal, células de Langerhans e melanócitos (HOANG-XUAN; BAUDOUIN; CREUZOT-GARCHER, 2001). Ainda, na região da conjuntiva palpebral, podem ser localizadas as glândulas tarsais (de Meibômio), glândulas sebáceas que secretam camada oleosa que retarda a evaporação da camada lacrimal, e as glândulas lacrimais acessórias (de Krause e de Wolfring), glândulas de secreção serosa (ROSS; PAWLINA, 2012) (Figura 2).



**Figura 2. Anatomia da conjuntiva humana.** A conjuntiva consiste em três segmentos: bulbar, forniceal e palpebral. (Figura modificada de PAULSEN; BERRY, 2006).

## 1.2. Conjuntivite Alérgica

A conjuntivite, inflamação da conjuntiva que normalmente afeta estruturas adjacentes como a córnea, as vias lacrimais e as pálpebras, é uma doença muito comum em adultos e crianças (PELIKAN, 2011). A resposta inflamatória dessa membrana pode ser causada por agentes infecciosos, tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas, ou por agentes não infecciosos, tais como substâncias químicas, lentes de contato e alergia (PELIKAN, 2011). Os sintomas e sinais da doença variam de acordo com o tipo de conjuntivite, mas de forma geral os indivíduos apresentam vermelhidão, irritação, edema de pálpebra e conjuntiva, secreção aquosa ou purulenta do olho. Ainda, o prurido

e a fotofobia costumam ser bastante intensos em alguns casos, particularmente nos processos alérgicos, com possibilidade de lesões em córnea e, conseqüente risco para a visão (ROSARIO; BIELORY, 2011; FRIEDLAENDER, 2011).

Nesse cenário, a conjuntivite alérgica (CA) é particularmente importante, pois estudos demonstram que 20-30% da população de países industrializados, tais como os Estados Unidos, sofre com problemas de alergia, dos quais 40-60% correspondem a alergias oculares. Ainda, estudos epidemiológicos demonstram alta taxa de indivíduos que sofrem de alergias oculares associadas a outras manifestações alérgicas como rinite e asma (ROSARIO; BIELORY, 2011; GERALDINE et al., 2013).

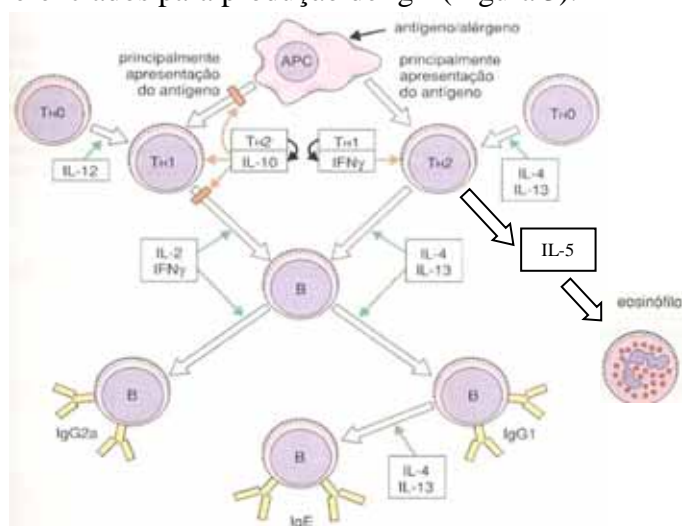
Na literatura são descritos seis tipos de CA: CA sazonal, CA perene, ceratoconjuntivite primaveril, ceratoconjuntivite atópica (com sua variação, blefaroceratoconjuntivite atópica), conjuntivite papilar gigante e dermatite de contato (MARBACK et al., 2007; FRIEDLAENDER, 2011; LA ROSA et al., 2013). As duas primeiras formas são as mais comuns e brandas, afetando de 15-20% da população, enquanto as ceratoconjuntivites representam as formas mais severas e podem afetar a córnea e, conseqüentemente, risco para a visão (FRIEDLAENDER, 2011). A conjuntivite papilar gigante e a dermatite de contato, embora não sejam desencadeadas pela produção de IgE, representam reações de hipersensibilidade do tipo IV provocadas por agentes não infecciosos, tais como lentes de contato ou substâncias químicas (FRIEDLAENDER, 2011).

No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos sobre a alergia ocular. Um desses trabalhos avaliou 207 pacientes atendidos em um centro de referência na cidade de São Paulo, mostrando maior incidência de ceratoconjuntivites primaveril (~39%) e atópica (~39%) com predomínio de formas crônicas e severas com potencial ameaça à função visual (MARBACK et al., 2007). Recentemente, um estudo realizado no Paraná, avaliou 3.120 adolescentes (entre 12 e 18 anos), por meio de um questionário validado com sintomas de CA, para verificar prevalência de sintomas, comorbidades e o impacto de alergia ocular nessa faixa etária (GERALDINI et al., 2013). Esse trabalho demonstrou ocorrências de CA entre 51% dos alunos, os quais apresentaram maior incidência de lacrimejamento (74%), fotofobia (50,1%) e sensação de corpo estranho (37,1%) nos olhos. Ainda, mostrou que os riscos de um adolescente com alergia ocular desenvolver asma, rinite e eczema atópico aumenta, além de uma incidência de 30,5% de relato de interferência grave nas atividades diárias (GERALDINI et al., 2013).

Nesse cenário, o estudo dessa patologia por meio de modelos experimentais representa uma ferramenta fundamental. Os modelos experimentais de alergia ocular têm sido desenvolvidos utilizando-se, principalmente, três espécies animais de laboratório (cobaia, rato e camundongo) imunizados com uma variedade de antígenos que incluem ovalbumina, pólen, ácaro e pelos de gato (GRONEBERG et al., 2003; STERN; SIESMASKO; NIEDERKORN, 2005; TAKEDA; GELFAND, 2009). Esses modelos experimentais têm permitido o estudo eficiente da fisiopatologia da conjuntivite relacionada às fases de indução e efetora da alergia, assim como propiciam a descoberta de mecanismos moleculares e abordagens terapêuticas potenciais.

### 1.3. Processo Inflamatório Alérgico: ativação de células imunes e produção de mediadores

A CA é definida como uma resposta inflamatória iniciada por reações de hipersensibilidade do tipo I (anafilática; IgE dependente e mediada por mastócitos e basófilos) e/ou IV (tardia; mediada por células T de memória) após exposição a um alérgeno (IRKEC; BOZKURT, 2012; DELVES et al., 2013). Portanto, a CA representa uma doença complexa do sistema imune envolvendo o processamento e apresentação de alérgeno pelos macrófagos, ativação dos linfócitos T para produção de citocinas e dos linfócitos B diferenciados para produção de IgE (Figura 3).



**Figura 3. Controle da resposta por IgE mediado por citocinas.** Nas reações de hipersensibilidade do tipo I, a ligação do alérgeno com células apresentadoras de antígenos (APC) estimula a produção de citocinas de perfil Th2, IL-4, IL-5 e IL-13 que favorecem a síntese de IgE pelos linfócitos B diferenciados e a quimioatração de eosinófilos para os tecidos. A produção de IL-10 pelas células Th2 inibe as respostas de células Th1. Por outro lado, as respostas das células Th1 a antígenos são favorecidas pela produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, que também suprimem o desenvolvimento das células Th2. (Figura modificada de ROITT et al., 1997).

Receptores de alta afinidade para as moléculas de IgE, FcεRI, estão presentes nas membranas dos mastócitos que são sensibilizados após a primeira etapa de contato com os alergênicos (IRKEC; BOZKURT, 2012). Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo, localizados próximos aos vasos sanguíneos e nervos periféricos em áreas expostas ao ambiente externo, como a pele e as mucosas do olho (conjuntiva), sistemas respiratório, digestório e urogenital e em órgãos linfoides secundários (OFFIAH; CALDER, 2009; IRKEC; BOZKURT, 2012). Essas células apresentam potentes mediadores bioativos pré-estocados em seus grânulos citoplasmáticos, tais como histamina, heparina, triptase e quimase, capazes de potencializar a migração e a proliferação celular, induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e, conseqüentemente, representam células efetoras nas respostas inflamatórias (OFFIAH; CALDER, 2009; IRKEC; BOZKURT, 2012). Além disso, os mastócitos, uma vez ativados, sintetizam mediadores, tais como prostaglandinas e leucotrienos, que potencializam os efeitos dos já liberados, prolongando sua ação no tecido.

Dessa maneira, em um novo contato com os alergênicos, a fase inflamatória é de rápido desenvolvimento, desencadeada pela ativação dos mastócitos que liberam seus mediadores biológicos e, conseqüentemente, desencadeia a fase aguda da doença caracterizada pelas manifestações clínicas como hiperemia bilateral, quemose conjuntival, edema de pálpebras e prurido. Assim, esses componentes celulares e humorais da CA são cruciais para a patogênese da doença e representam alvos terapêuticos potenciais (IRKEC; BOZKURT, 2012).

Secundariamente ocorre uma fase mais tardia da resposta inflamatória causada pela migração de outras células imunes para o local, principalmente eosinófilos, monócitos e linfócitos, que também liberam citocinas capazes de prolongar a reação alérgica que passa a ser uma resposta do tipo IV ou tardia. Na alergia ocular, essa fase parece ter uma contribuição direta de mastócitos IgE-ativados de acordo com estudos desenvolvidos por FUKUDA et al. (2009) com camundongos deficientes para essas células. Após indução de conjuntivite por pólen, esses animais não demonstraram os sinais clínicos da patologia observados no grupo de animais selvagens e, na fase tardia (24 horas), demonstraram menor infiltração de eosinófilos. Esses efeitos foram revertidos após reconstituição dos mastócitos nos animais deficientes, mostrando papel fundamental dessas células nas fases inicial e tardia da alergia ocular (FUKUDA et al., 2009).

A associação entre eosinófilo e doenças alérgicas já é conhecida de longa data, embora até 1980 acreditava-se que estas células tivessem ação anti-inflamatória. Este falso conceito mudou após o reconhecimento da alta toxicidade das proteínas contidas nos grânulos dos eosinófilos, para os helmintos e para as células epiteliais do trato respiratório. Na atualidade os eosinófilos são considerados células pró-inflamatórias que medeiam as manifestações das doenças alérgicas, incluindo a asma. A ativação e a infiltração dessas células são responsáveis por complicações na córnea na doença alérgica crônica (IRKEC; BOZKURT, 2012). Os eosinófilos ativados liberam proteínas ricas em arginina, altamente tóxicas que se ligam à membrana basal através dos proteoglicanos e ácido hialurônico, e provocam desagregação celular e descamação epitelial, levando a lesão do epitélio da córnea e ulceração na ceratoconjuntivite vernal (primaveril) e ceratoconjuntivite atópica. Os níveis da proteína eosinofílica catiônica (ECP) mostraram uma forte correlação linear positiva com sinais clínicos de ceratoconjuntivite atópica, e, após tratamento com tracrolimus, os níveis de ECP reduziram significativamente no fluido lacrimal dos pacientes (IRKEC; BOZKURT, 2012).

O controle e modulação das respostas inflamatórias ocorrem em grande parte pela ação das citocinas, polipeptídeos multifuncionais de 8 a 30 kDa, sintetizados por diferentes células do sistema imune. De acordo com suas características funcionais, as citocinas são divididas em subgrupos: interleucinas (IL, numeradas sequencialmente como IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (TNF), fatores estimuladores de colônia (CSF), interferons (IFN), fatores de crescimento mesenquimal (TGF $\beta$ ) e quimiocinas (citocinas quimioatraentes) (DE OLIVEIRA et al., 2011; DELVES et al., 2013). Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autocrino (nas próprias células produtoras). Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (DE OLIVEIRA et al., 2011; DELVES et al., 2013). A produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de



citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF) pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando a insuficiência de múltiplos órgãos e a morte. As citocinas Th2 (IL-4, IL-10) podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Dentre os subgrupos de citocinas, as quimiocinas se destacam nas respostas inflamatórias por serem responsáveis pela quimiotaxia de células imunes. Particularmente nas reações alérgicas, as quimiocinas CCL2/MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), CCL5/RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and presumably Secreted*) e CCL11/eotaxina-1 tem papel fundamental (OFFIAH; CALDER, 2009).

A RANTES é sintetizada principalmente por linfócitos T, plaquetas e células endoteliais constituindo-se um fator quimiotático para monócitos, linfócitos T, célula NK, eosinófilos e basófilos, com atuação ainda na ativação de células T. A eotaxina é produzida pelas células endoteliais, monócitos e linfócitos T, e atua como quimioatraente para eosinófilos, macrófagos e linfócitos T. A MCP-1 é secretada por monócitos/macrófagos, que representam sua principal fonte, mas também pode ser secretada por células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (DESHMANE et al., 2009). Seu papel está relacionado à quimiotaxia de monócitos/macrófagos, linfócitos citotóxicos e células NK, além de promover a diferenciação para Th2, favorecendo a hipersensibilidade tipo 1, e desgranulação dos mastócitos (FORTE, 2007; DESHMANE et al., 2009; TOMINAGA et al., 2009).

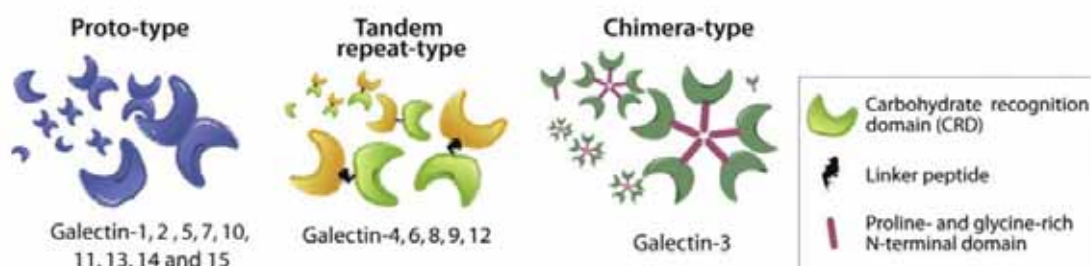
Em estudo envolvendo modelo experimental de CA induzida por pelo de gato, camundongos deficientes em eotaxina apresentaram redução da reação de hipersensibilidade imediata, apesar de apresentarem níveis normais de mastócitos no tecido e de IgE (MIYAZAKI et al., 2009). Este efeito foi associado ao bloqueio da desgranulação dos mastócitos, mediado pelo receptor CCR3, como demonstrado *in vitro* pela incubação de anticorpos anti-CCR3 com mastócitos isolados e que, após estímulo por alergênio, permaneceram intactos. Ainda, em pesquisas usando o modelo de CA induzida por pólen, o MCP-1 (ligante de CCR2) foi identificado no grupo de genes relacionados ao processo de ativação dos mastócitos e, foi significativamente inibido pelo bloqueio do receptor CCR3. Outros experimentos em que o anticorpo anti-MCP-1 foi administrado nos animais antes do desafio com alergênio, resultaram em ablação completa do recrutamento de eosinófilos, destacando um importante eixo MCP-1/eotaxina/CCR3 em alergia ocular (TOMINAGA et al., 2009).

#### 1.4. Galectina-1

O tratamento farmacológico dos processos inflamatórios oculares, especialmente a CA, inclui anti-histamínicos, estabilizadores da membrana de mastócitos, anti-inflamatórios não esteroides e corticosteroides. Esses últimos, utilizados nas conjuntivites mais severas e com maior risco de efeitos adversos, como o aumento da pressão intraocular e cataratogênese (FRIEDLAENDER, 2011; PACHARN; VICHYANOND, 2013).

Nesse aspecto, a investigação de novos agentes farmacológicos que tenham maior eficácia no controle da resposta inflamatória com menos efeitos adversos é fundamental. Ressaltamos como potencial agente anti-inflamatório a galectina-1 (Gal-1), proteína de 14,5 kDa que regula o processo inflamatório e cujas propriedades foram avaliadas em vários modelos de inflamação crônica e autoimunidade, incluindo encefalomielite autoimune, artrite, uveíte e hepatite (RABINOVICH et al., 1999; SANTUCCI et al., 2000; TOSCANO et al., 2006; HOKAMA; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A., 2008; ILARREGUI et al., 2009).

As galectinas são caracterizadas pela sua afinidade aos  $\beta$ -galactosídeos e pela apresentação de uma sequência conservada de 135 aminoácidos no domínio reconhecedor de carboidrato - CRD (LEFFLER et al., 2004). Várias funções têm sido atribuídas a essas proteínas, que incluem: adesão celular, regulação do crescimento celular, embriogênese, metástase, *splicing* do pré-RNA, imunomodulação, inflamação e apoptose (RABINOVICH et al., 2002; COOPER et al., 2010). Em mamíferos, 15 membros dessa família foram descritos e clonados (LIU; RABINOVICH, 2010). Com base na organização estrutural, as galectinas são classificadas em três subfamílias: prototípicas, *tandem-repeats* (do tipo repetições em sequência) e quiméricas. As galectinas prototípicas (galectinas 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 (~30 kDa). A subfamília *quimérica* tem como único representante a galectina-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 4.



**Figura 4.** Subdivisão das galectinas baseada em sua organização estrutural. (Figura Modificado de RABINOVICH; CROCI, 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 tolerância imunológica. A expressão, secreção e distribuição celular desta proteína são altamente susceptíveis à modulação por diferentes estímulos inflamatórios, como por exemplo, peptídeos quimiotáticos, lipopolissacarídeo (LPS), fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e carragenina (RABINOVICH et al., 2002; GIL et al., 2006a).

A ação anti-inflamatória da Gal-1 tem sido evidenciada em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* após administração exógena da Gal-1 recombinante (rGal-1) (GIL et al., 2006a; LA et al., 2003; COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008). Nos modelos *in vitro* a incubação com a rGal-1 inibiu a migração dos neutrófilos (LA et al., 2003) e linfócitos humanos (NORLING et al., 2008) através das células endoteliais após estímulo inflamatório com a citocina IL-8 ou TNF- $\alpha$ , respectivamente. Nas investigações dos modelos *in vivo*, os efeitos da rGa-1 foram associados com a inibição da desgranulação dos mastócitos na pata de ratos após administração da fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha (RABINOVICH et al., 2000) e do extravasamento dos neutrófilos para a cavidade peritoneal, após 4 horas da aplicação da carragenina em ratos (GIL et al., 2006a), do zymosan (GIL; GULLO; OLIANI, 2010) e da IL-1 $\beta$  em camundongos (LA et al., 2003). Esse efeito antimigratório da Gal-1 parece estar associado à 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 (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) (NORLING et al., 2008).

Em modelos experimentais de doenças autoimunes, a Gal-1 é capaz de alterar a secreção de citocinas, reduzindo os níveis de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e IL-12, e aumentando os de IL-5 e IL-10 (RABINOVICH et al., 1999; TOSCANO et al., 2006; SANTUCCI et al., 2003) consequentemente, regulando a atividade dos linfócitos. A modulação positiva da IL-10 é relevante em modelo de conjuntivite alérgica, uma vez que essa citocina foi apontada como um regulador da desgranulação de mastócitos (BUNDOC; KEANE-MYERS, 2007). Ainda, em modelo de hipersensibilidade tardia, um intenso recrutamento de linfócitos foi observado nas patas de camundongos nocautes para Gal-1 em relação aos selvagens, demonstrando seu papel no controle da migração desse tipo celular (NORLING et al., 2008). No entanto, os mecanismos pelos quais a Gal-1 modula as respostas celulares nos processos inflamatórios alérgicos ainda não estão completamente determinados, especialmente nos modelos oculares.

Diante dessas considerações e da necessidade de novas terapias em substituição às atuais que apresentam o risco de efeitos adversos (READ et al., 2006; ROSENBAUM, 2010) nos tratamentos de conjuntivite e outros processos inflamatórios alérgicos, avaliamos a proteína Gal-1 endógena e seu efeito exógeno em modelo experimental de CA induzido por ovalbumina (OVA) em camundongos.



## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

Analisar o papel da proteína Gal-1 na alergia ocular por meio de modelo experimental de conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos, tratados ou não com a Gal-1 recombinante (rGal-1) ou dexametasona (Dex).

Assim, os objetivos específicos desse trabalho foram:

- i) Avaliar o efeito anti-inflamatório da rGal-1 na conjuntivite alérgica e o seu mecanismo de ação, por meio de:
  - escore clínico dos olhos dos animais, após desafio com ovalbumina no 14º, 15º e 16º dias, tratados ou não com rGal-1 ou Dex;
  - dosagem da imunoglobulina E (IgE) anti-OVA no plasma dos animais com conjuntivite alérgica após 4 e 24 horas, tratados ou não com a rGal-1 ou Dex em comparação com o grupo controle;
  - análise quantitativa dos leucócitos circulantes, após 4 e 24 horas da última instilação de OVA, nos animais tratados com a rGal-1 ou Dex em comparação com o grupo não tratado;
  - análise histopatológica e quantificação das células inflamatórias na conjuntiva bulbar, por meio dos métodos de coloração hematoxilina-eosina e azul de toluidina;
  - dosagem de citocinas e quimiocinas por painel multiplex nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos cervicais.
  
- ii) Avaliar a expressão da proteína Gal-1 endógena nos grupos controle, conjuntivite alérgica (4 e 24 horas), tratados com rGal-1 ou Dex, por meio de imuno-histoquímica em cortes de parafina da conjuntiva bulbar dos camundongos.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem Balb/c, pesando entre 20-25g, foram obtidos no CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais Para Medicina e Biologia) da UNIFESP, com seis a oito semanas de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP, em um ambiente com temperatura (22-25°C) e luminosidade (ciclo de 12 horas claro/escuro) controlada, e receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFESP (CEP nº 1984/11).

#### 3.2. Modelo experimental de conjuntivite alérgica e protocolos de tratamentos farmacológicos

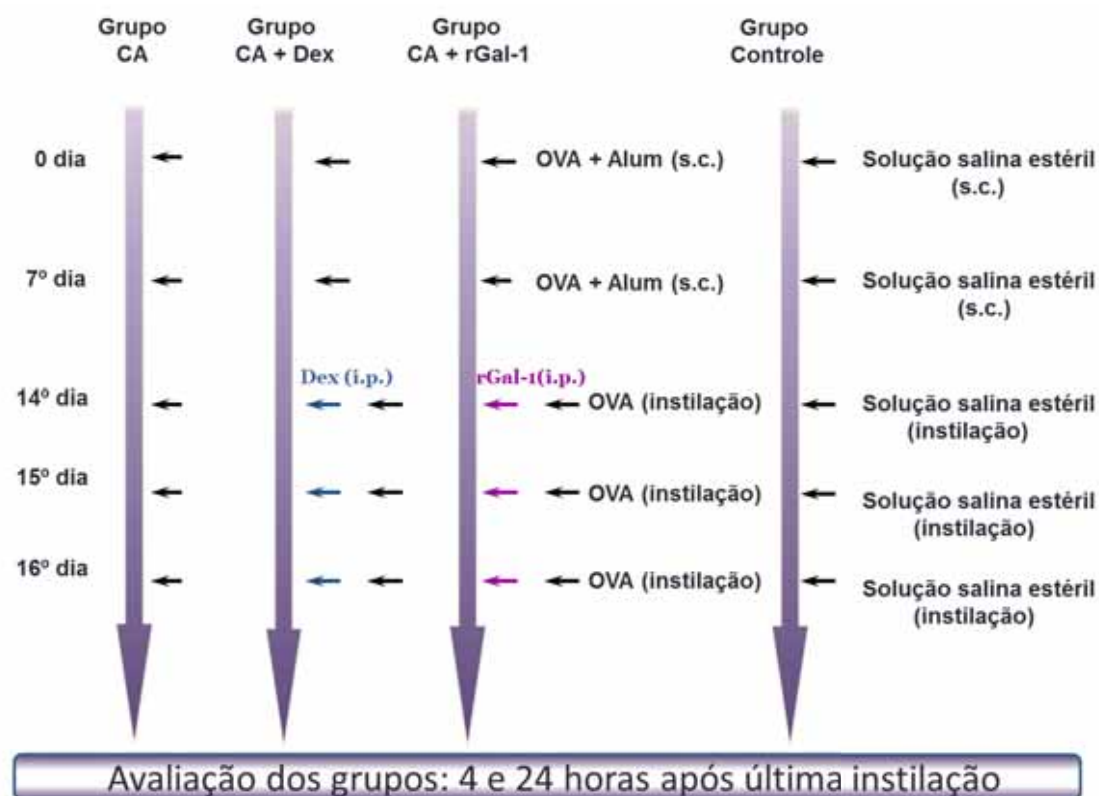
Os animais foram divididos em sete grupos experimentais (n = 5/grupo). A imunização dos animais foi realizada nos dias 0 e 7 com solução injetável via subcutânea (s.c.) de 5 µg de ovalbumina (OVA; grau V; Sigma-Aldrich, EUA) e 15 mg/mL do adjuvante hidróxido de alumínio (ALUM; Sigma-Aldrich) diluídos em 200 µL de solução salina estéril, e de acordo com estudos prévios (SHOJI et al., 2005; CHUNG; NAM; KWEON, 2009) com modificações. Nos dias 14, 15 e 16, após anestesia via intraperitoneal (i.p.) com quetamina (100 mg/kg; Ketalar/Parke-Daves) e xilazina (20 mg/kg; Rompum/Bayer), os animais receberam instilação direta no saco conjuntival de 250 µg de OVA em 10 µL de salina estéril. Os animais controles receberam apenas salina estéril. Vinte minutos após o desafio com OVA, os camundongos foram examinados para constatar clinicamente a ocorrência ou não de conjuntivite (item 3.3). Após 4 e 24 horas do último desafio com OVA, os animais foram anestesiados via i.p (quetamina e xilazina, 100 e 20 mg/Kg) e submetidos à punção cardíaca para obtenção de sangue em seringa com EDTA a 10% para análises de quantificação celular (item 3.4) e dos níveis de IgE anti-OVA (item 3.6). O fluido lacrimal foi coletado por meio da instilação direta de 10 µL de salina no saco conjuntival por duas vezes em cada olho, obtendo-se um *pool* de 40 µl/animal, e ambos congelados a - 80°C. Posteriormente, ainda sob efeito da anestesia, os animais foram



sacrificados por deslocamento cervical para enucleação dos olhos e retirada dos linfonodos cervicais. Os olhos direitos foram fixados e processados como descrito no item 3.4.1 e o fluido lacrimal, olhos esquerdo e linfonodos foram congelados - 80°C para processamento e dosagem de citocinas e quimiocinas por painel multiplex (item 3.7).

Para determinar o papel anti-inflamatório da proteína Gal-1 nesse modelo, os camundongos sensibilizados foram pré-tratados via i.p. nos dias 14, 15 e 16 com a proteína Gal-1 recombinante (rGal-1; Peptotech, EC Ltd, London, UK) na concentração de 0,3 µg por animal (LA et al., 2003; GIL et al., 2010) ou dexametasona (1 mg/kg, Sigma-Aldrich) (DAMAZO et al., 2006), diluídos em 0,1 mL de solução salina estéril, 15 minutos antes da instilação de OVA. Após 4 e 24 horas da última instilação de OVA, os animais foram sacrificados para as mesmas coletas realizadas nos grupos descritos anteriormente.

As figuras 5 e 6 mostram o protocolo experimental e o processamento das amostras:



**Figura 5. Protocolo experimental para indução da conjuntivite alérgica (CA) em camundongos.** Cada grupo experimental foi constituído por cinco animais.

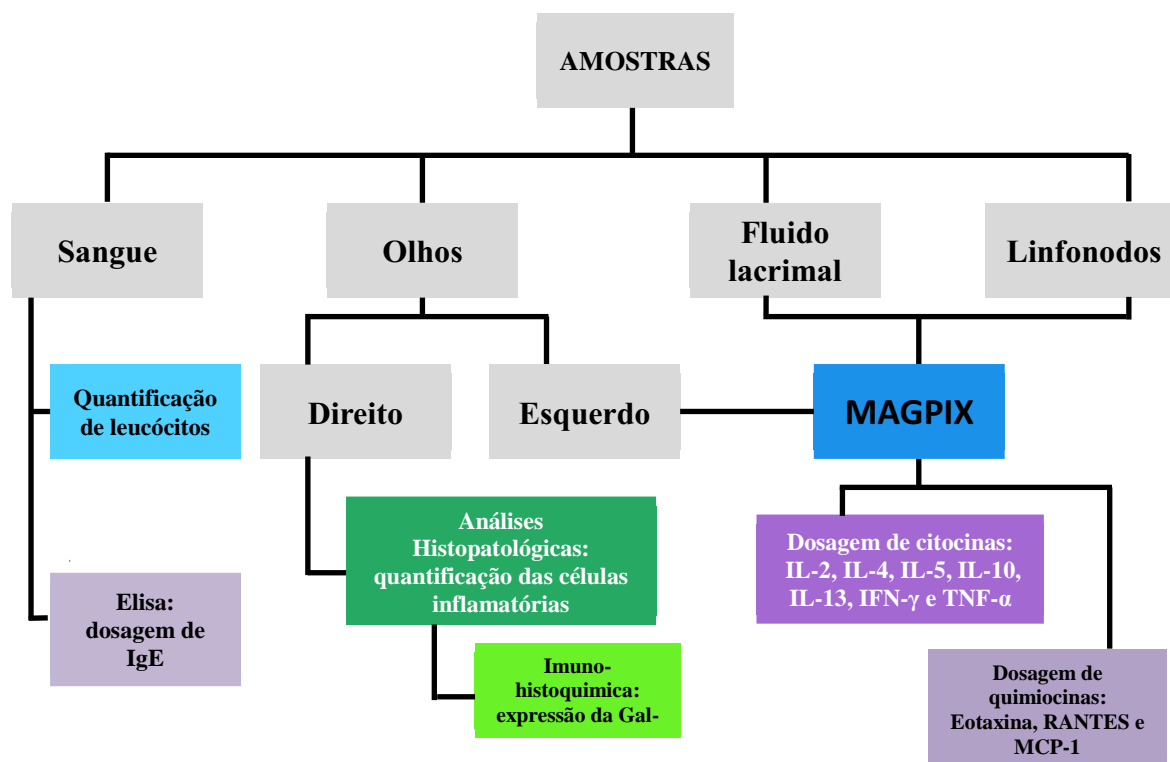


Figura 6. Esquema de processamento das amostras coletadas para cada grupo experimental.

### 3.3. Escore clínico

No modelo de CA o escore clínico foi avaliado após 20 minutos do desafio com OVA por instilação direta nos olhos dos animais, nos dias 14, 15 e 16. A avaliação de ocorrência ou não da conjuntivite foi realizada pela observação de quatro sinais clínicos: edema de conjuntiva, hiperemia de conjuntiva, edema de pálpebra e lacrimejamento. Essa avaliação seguiu uma graduação de zero a três cruzeiros para cada sinal, adaptando-se uma tabela de escore (Tabela 1) (MAGONE et al.,1998). Nesse aspecto, cada animal recebeu um escore clínico total de zero a doze cruzeiros, proporcionalmente à intensidade da conjuntivite.

Tabela 1. Avaliação clínica da conjuntivite alérgica

Condição clínica	Graduação			
	Ausente (0)	Leve (1+)	Moderada (2+)	Severa (3+)
<b>Edema de conjuntiva</b>	Ausente	Leve edema	Edema óbvio	<b>Edema severo (*)</b>
<b>Hiperemia da conjuntiva</b>	Ausente	Hiperemia mínima	Hiperemia moderada	<b>Hiperemia severa</b>
<b>Edema de pálpebra</b>	Ausente	Leve edema	Moderado edema	<b>Edema severo (**)</b>
<b>Lacrimajamento</b>	Ausente	Leve	Moderado	<b>Severo</b>
<b>Total de escore</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>

(\*) margem palpebral 3-4 vezes mais grossa que a condição basal; (\*\*) incapacidade de abrir o olho.

### 3.4. Análise histopatológica e quantificação das células inflamatórias

#### 3.4.1. Olhos

Os olhos direitos foram fixados, após 4 e 24 horas da última instilação de OVA, em formol tamponado a 10%. Os mesmos foram lavados em água corrente (após 24 horas), desidratados em uma série decrescente de etanol e, incluídos em parafina. Cortes de 4  $\mu\text{m}$  foram obtidos no micrótomo Leica RM2155, desparafinizados e corados pela hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica e quantificação dos leucócitos, e pelo azul de toluidina a 0,5% para quantificação dos mastócitos.

As células foram quantificadas utilizando-se objetiva de 63X no microscópio ZEISS, AXIOSKOP 2, do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP. As áreas de cada tecido foram obtidas com o auxílio do *software* analisador de imagem Axiovision 4.8 (ZEISS). Os valores foram demonstrados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) do número de células por 0,1  $\text{mm}^2$  de três cortes semi-seriados, com distância de 12  $\mu\text{m}$  entre cada secção.

#### 3.4.2. Sangue periférico

Após a coleta de sangue com anticoagulante EDTA, 10  $\mu\text{L}$  de sangue total para cada amostra foram diluídos na solução de Turk (0,1% de violeta cristal diluído em 3% de ácido acético), na proporção de 1: 20 para quantificação dos leucócitos em câmara de

Neubauer. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. do número de células  $\times 10^5/\text{mL}$ .

### 3.5. Imuno-histoquímica

Para a investigação da expressão da proteína endógena Gal-1 na conjuntiva bulbar dos camundongos, foram utilizados cortes de 4  $\mu\text{m}$  preparados em lâminas silanizadas a 4%. Após o processo de desparafinização em xilol e reidratação em álcoois graduados (etanol absoluto, 85% e 50%), foi efetuada a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 no micro-ondas, durante 1 minuto na potência alta e aproximadamente 5 minutos na potência 50. As secções foram lavadas com água destilada e, posteriormente, realizou-se a inativação de peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 30 minutos. Após lavagem em tampão fosfato salina (PBS), realizamos a incubação do material com o anticorpo policlonal *rabbit* anti-Gal-1 (Zymed Laboratories, Cambridge, UK), na diluição 1:200 em soro albumina bovina a 1% (BSA), por 16-18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário (kit Histostain-SP, Invitrogen, EUA). Os fragmentos foram tratados com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Invitrogen), por 20 minutos em câmara úmida, e revelados com 3,3'- diaminobenzidina (DAB, Invitrogen). Após, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo da reação foi obtido omitindo-se o anticorpo primário.

A análise da expressão da proteína Gal-1 foi realizada por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no epitélio e lâmina própria da conjuntiva por meio de fotomicrografias ( $n = 5$  animais/grupo) obtidas no microscópio AXIOSKOP 2 (ZEISS, Germany), do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP, São Paulo, SP, com objetiva de 40X, e analisadas pelo *software* Axiovision 4.8 (ZEISS). Para obtenção das médias relacionadas com a expressão da proteína, foram marcados em cada fotomicrografia 20 pontos imunorreativos para Gal-1 nas células epiteliais e lâmina própria da conjuntiva. Os valores foram expressos como média  $\pm$  S.E.M.

### 3.6. Análise dos níveis de IgE anti-ovalbumina (OVA) por ELISA

Amostras de sangue foram coletadas dos animais nas diferentes condições experimentais e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos para precipitação das células sanguíneas, e coleta do plasma para a dosagem de IgE anti-OVA pelo método de ELISA. Utilizamos kit de imunoenensaio específico para essa proteína comercialmente disponível (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), seguindo as instruções do fabricante. Todas as estimações foram feitas em duplicata e os resultados demonstrados como média  $\pm$  S.E.M. de proteína (ng/mL).

### 3.7. Análise dos níveis de citocinas e quimiocinas por painel multiplex

Para análise de citocinas e quimiocinas nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos dos animais nas diferentes condições experimentais, utilizamos o painel multiplex MCYT MAG-70K-PX32 (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e o equipamento LUMINEX xMAP MAGPIX (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), capaz de detectar múltiplos analitos com rapidez e especificidade, por meio de *beads* magnéticas, do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP.

Dez analitos foram estudados: as citocinas, IL -2, -4, -5, -10, -13, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e as quimiocinas RANTES, eotaxina, e MCP-1. A concentração dos analitos foi determinada pelo software *MAGPIX xPONENT* (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e os resultados descritos como média  $\pm$  S.E.M. de citocinas em pg/mL.

Para realização das dosagens, o fluido lacrimal foi coletado como descrito no item 3.2. Os órgãos foram macerados em nitrogênio líquido, transferidos para microtubos contendo coquetéis completos de inibidores de proteases livre de EDTA (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) e de inibidores de fosfatases (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), diluídos em 500 $\mu$ L de solução tampão de lise (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM) e 1% de Triton-x, pH 7,4. Os microtubos foram mantidos no gelo por 15 minutos sob agitação constante, centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos, e os sobrenadantes armazenados a - 80°C em novos microtubos para serem utilizados posteriormente.

Para a realização do ensaio multiplex, as *beads* magnéticas, soluções controles, padrões e tampão de lavagem foram preparados e homogeneizados conforme as

instruções do fabricante. Inicialmente, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  dos padrões, soluções controle e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada previamente com o tampão de lavagem. Em seguida, 25  $\mu\text{L}$  de *assay buffer* foi adicionado às amostras e aos padrões e, 25  $\mu\text{L}$  de *beads* magnéticas revestidas com anticorpos específicos (MCYTMAG-70K-PX32, MILLIPLEX MAP, Millipore Corporation, EUA) adicionados em todos os poços (controles, padrões e amostras). A placa foi selada, revestida com papel alumínio e incubada *overnigh* a 4°C, sob agitação. No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com 200 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e, incubada com 25  $\mu\text{L}$  de anticorpo de detecção ligado a biotina à temperatura ambiente, por 1 hora sob agitação. Para completar a reação, 25  $\mu\text{L}$  de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada nos poços para incubação por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, a placa foi lavada duas vezes, incubada com 150  $\mu\text{L}$  de fluido específico do equipamento (*Drive Fluid*) por cinco minutos para, em seguida, realizarmos a dosagem dos analitos no LUMINEX xMAP MAGPIX.

### 3.8. Análises estatísticas

Todos os dados foram demonstrados como média  $\pm$  erro padrão das médias. Diferenças estatísticas foram comparadas pela ANOVA, seguidas, se significantes, pelos testes de Bonferroni e/ou t de student. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

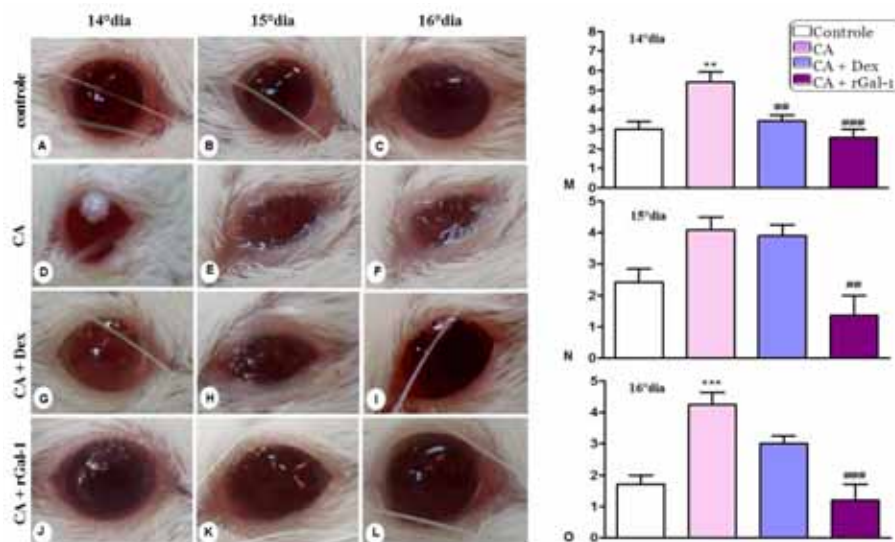


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Escore clínico

Inicialmente, avaliamos a resposta clínica dos animais no modelo de CA, nos dias 14, 15 e 16, após 20 minutos da instilação de ovalbumina (OVA) nos olhos. O grupo CA demonstrou sinais clínicos caracterizados por edema palpebral, lacrimejamento e hiperemia conjuntival (Figuras 7D-F) em relação ao grupo controle (Figuras 7A-C). Os tratamentos farmacológicos com dexametasona (CA+Dex) e galectina-1 recombinante (CA+rGal-1), mostraram efeito anti-inflamatório, com declínio destes sinais clínicos (Figuras 7G-L) comparados ao grupo CA.

O escore realizado para os quatro sinais clínicos (edema de conjuntiva, hiperemia de conjuntiva, edema de pálpebra e lacrimejamento) nos olhos dos animais confirmou aumento significativo da resposta inflamatória causada pelo desafio com OVA no grupo CA comparado ao controle, nos dias 14-16 (Figuras 7M-O). O tratamento farmacológico com a rGal-1 mostrou diminuição significativa dos sinais clínicos da conjuntivite nos três dias observados e comparado ao grupo não tratado (CA), enquanto a Dex reduziu esses sinais no 14º dia (Figuras 7M).



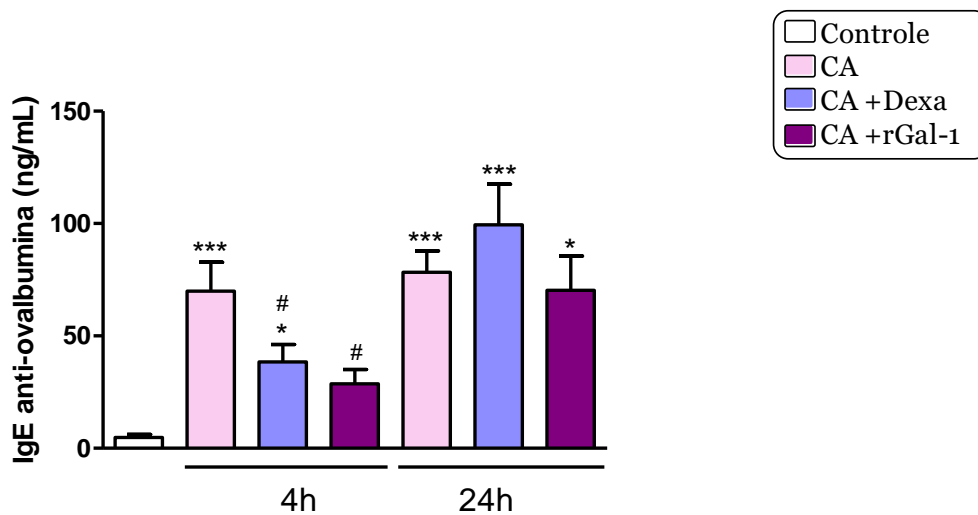
**Figura 7. Avaliação dos olhos dos animais após 20 minutos da instilação de ovalbumina (OVA) nos dias 14, 15 e 16. [A-C]** Grupo controle (instilação com salina estéril). **[D-F]** Grupo Conjuntivite Alérgica (CA). **[G-I]** Grupo CA tratado com dexametasona (CA+Dex). **[J-L]** Grupo CA tratado com galectina-1 recombinante (CA+rGal-1). Edema palpebral, lacrimejamento e hiperemia conjuntival foram observados nos animais com CA **[D-F]**. O tratamento farmacológico com dexametasona e rGal-1, demonstrou uma diminuição dos sinais clínicos **[G-L]** comparado ao grupo CA **[D-F]**. **[M-O]** Escore clínico. Os dados representam as médias  $\pm$  S.E.M do escore avaliado após 20 minutos do desafio com OVA ou salina estéril (grupo controle) (n = 5 animais/grupo). \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. Controle; ##p < 0,01; ###p < 0,001 vs. CA.



#### 4.2. Efeito do tratamento farmacológico com rGal-1 nos níveis de IgE anti-OVA

Os níveis de IgE anti-OVA foram dosados no plasma dos grupos controle e experimentais CA (4 e 24 horas), CA+Dex (4 e 24 horas) e CA+rGal-1 (4 e 24 horas) e seus dados mostrados na Figura 8.

Os animais, sensibilizados por OVA, aumentaram significativamente essa imunoglobulina no sangue, após 4 e 24 horas, em comparação aos animais que receberam somente salina estéril (grupo controle), confirmando a eficácia do nosso modelo experimental de CA. Os tratamentos farmacológicos diminuíram significativamente os níveis desse anticorpo na fase inicial da resposta (4 horas) e na fase tardia (24 horas) mantiveram níveis elevados em relação ao grupo controle (Figura 8).



**Figura 8. Dosagem de IgE anti-OVA.** Os dados representam as médias  $\pm$  S.E.M dos níveis da imunoglobulina (ng/mL) dos diferentes grupos experimentais (n = 5 animais/grupo). CA, conjuntivite alérgica; CA+Dex, tratado com dexametasona; CA+rGal-1, tratado com rGal-1. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs. Controle do correspondente tempo experimental; #p < 0,05 vs. CA.

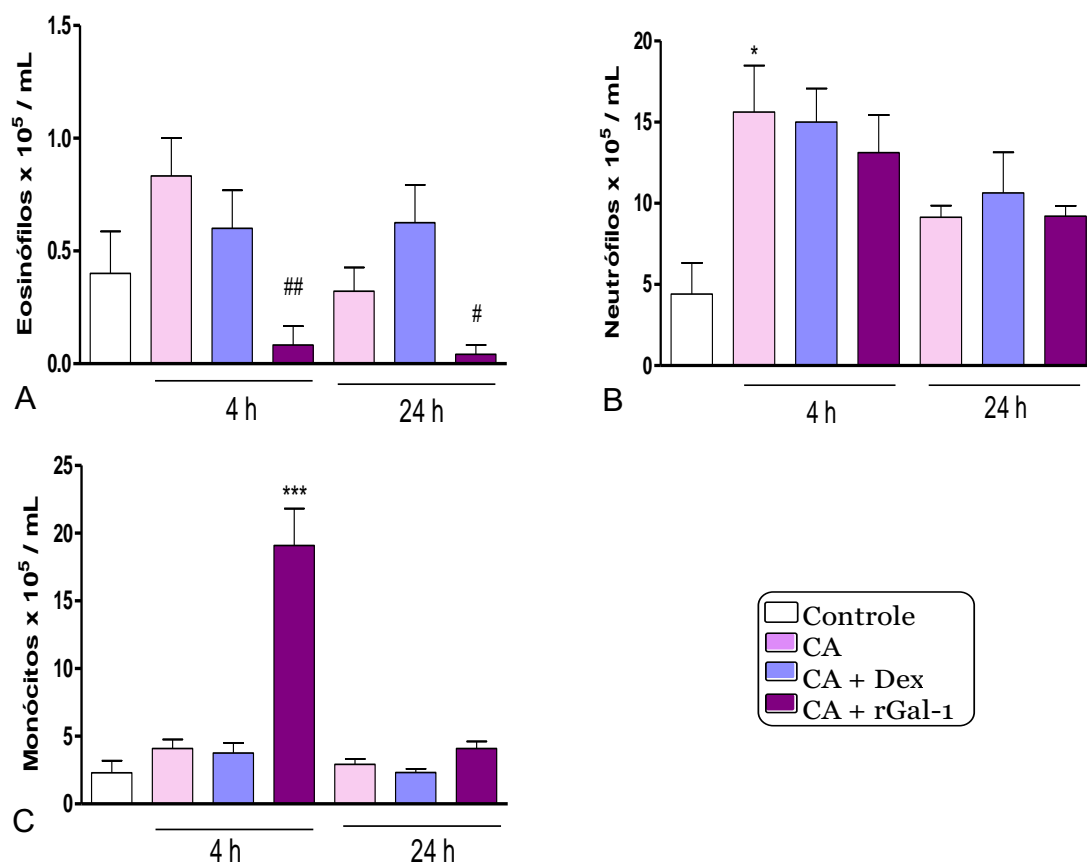
#### 4.3. Quantificação dos leucócitos circulantes e efeito do tratamento farmacológico com a proteína rGal-1

A resposta inflamatória alérgica provocada pelo modelo de CA induzido pela OVA foi investigada por meio da quantificação de eosinófilos, neutrófilos e monócitos do sangue dos camundongos nos diferentes grupos experimentais.

Após 4 horas do último desafio com OVA, os animais do grupo CA apresentaram aumento significativo de neutrófilos (Figura 9B) circulantes, comparado ao

controle. No tempo experimental mais tardio, 24 horas, os grupos CA e controle mostraram pouca alteração no número de eosinófilos e neutrófilos (Figuras 9A e B, respectivamente). Em relação aos monócitos, não houve alteração do número de células no grupo CA em relação ao controle nos dois tempos experimentais analisados (Figura 9C).

O tratamento farmacológico com Dex (CA+Dex) não produziu diferenças significantes no número de leucócitos (eosinófilos, neutrófilos e monócitos), após 4 e 24 horas, comparado aos grupos CA (Figura 9). Por outro lado, a administração de rGal-1 apresentou redução significativa do número de eosinófilos (Figura 9A), após 4 e 24 horas, comparado ao grupo CA, mas não alterou o número de neutrófilos (Figura 9B). Ainda, o tratamento com essa lectina induziu aumento significativo de monócitos na fase inicial da resposta inflamatória alérgica, 4 horas, comparado aos grupos controle, CA e aos tratados com Dex (CA+Dex) (Figura 9C).



**Figura 9. Quantificação dos leucócitos no sangue.** O efeito anti-inflamatório da rGal-1 foi associado a diminuição do número de eosinófilos, após 4 e 24h, e aumento significativo do número de monócitos, após 4h, comparado ao grupo CA. Os dados representam a média  $\pm$  S.E.M. do número de células  $\times 10^5$  por mL ( $n = 5$  animais/grupo). # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$  vs. CA do correspondente tempo experimental; \* $p < 0,05$  vs. Controle; \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle, CA e CA+Dex 4h.

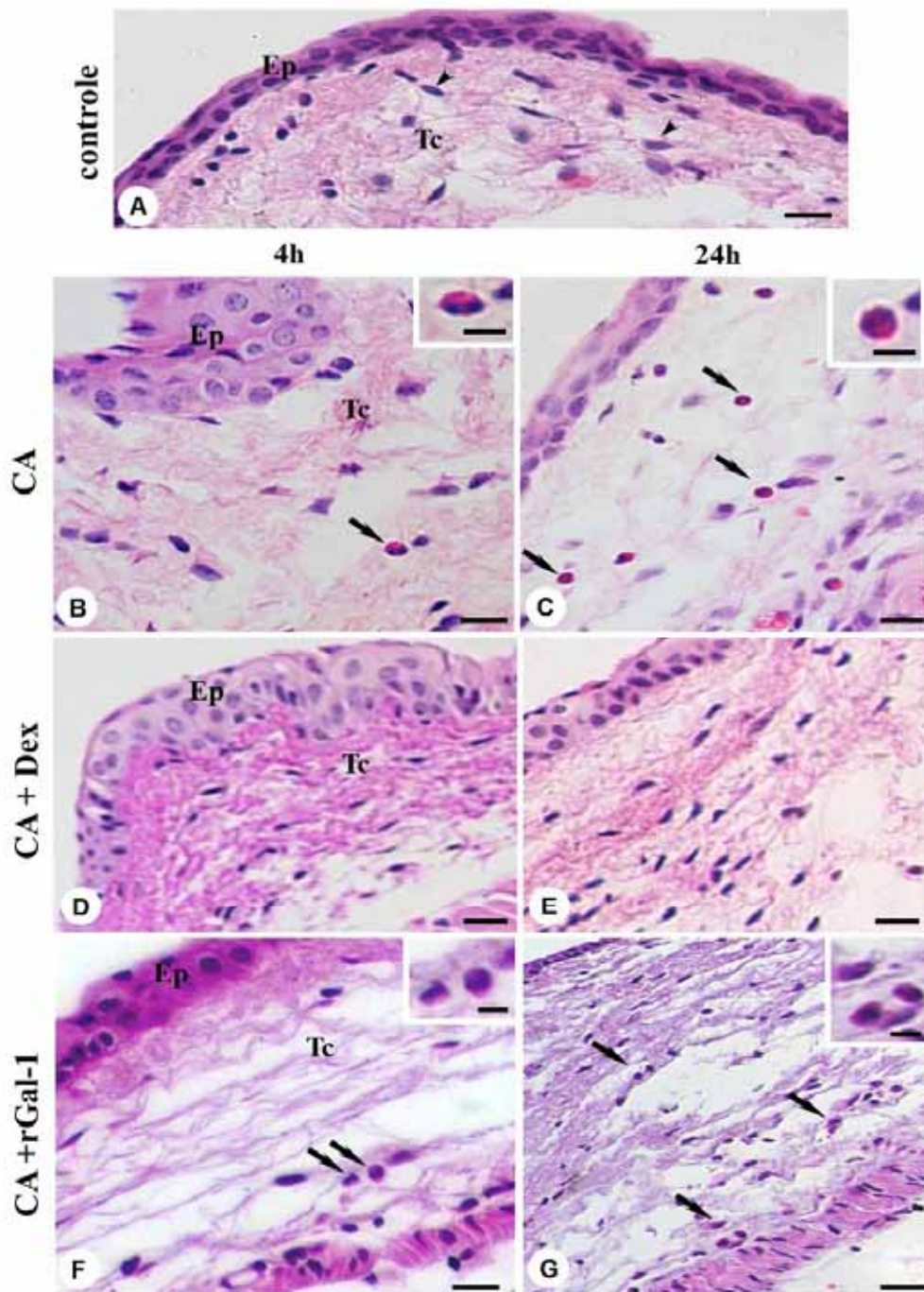
#### 4.4. Histopatologia: resposta inflamatória alérgica na conjuntiva bulbar e efeito do tratamento farmacológico com a proteína rGal-1

Para a avaliação da resposta inflamatória associada ao modelo de CA, analisamos as conjuntivas bulbares dos globos oculares nos diferentes grupos experimentais.

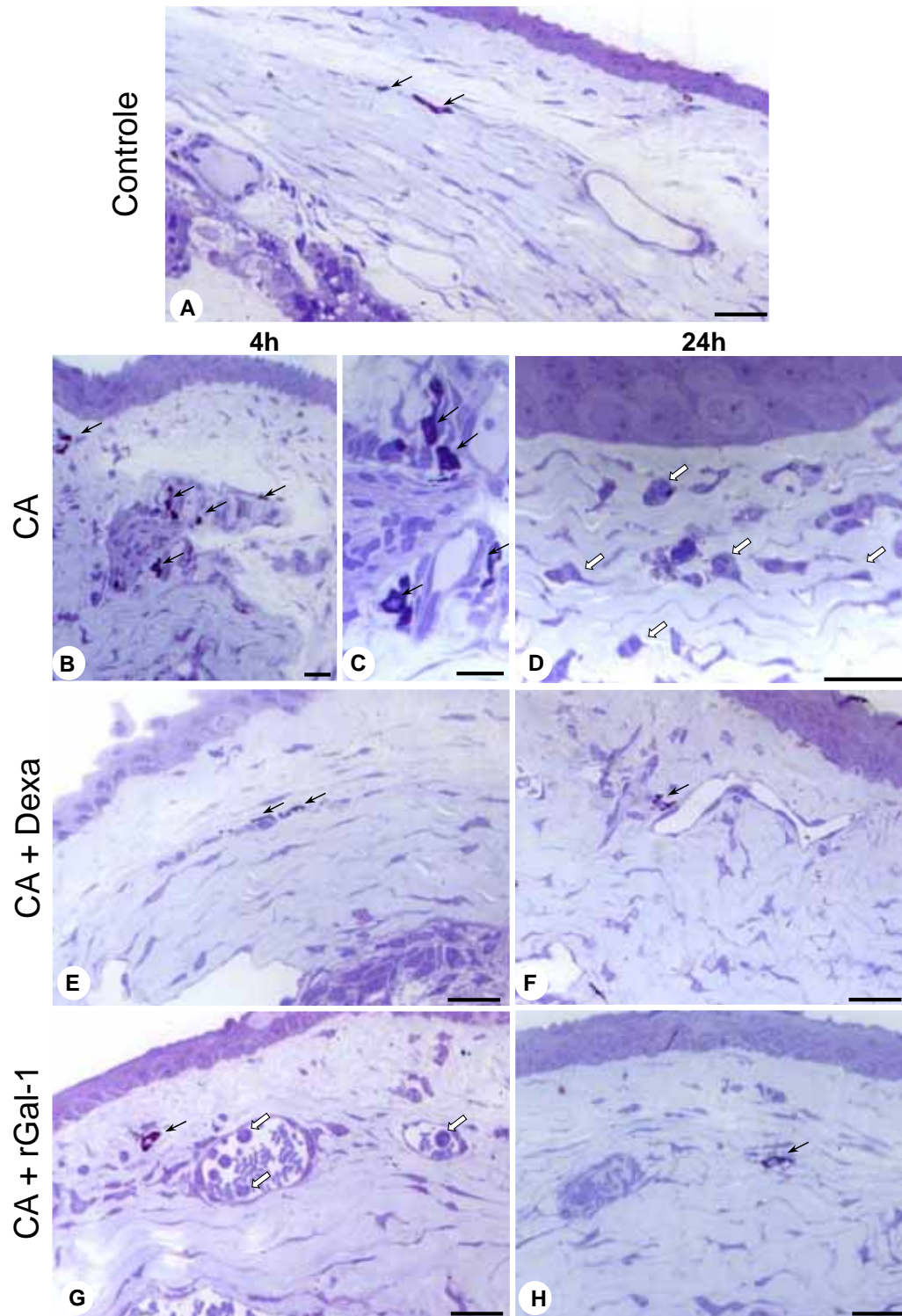
A análise histológica dos olhos dos camundongos desafiados com salina estéril (controle) demonstrou conjuntiva de aspecto normal com tecido conjuntivo apresentando células residentes, tais como fibroblastos (Figuras 10A) e mastócitos intactos (Figura 11A). No entanto, os animais que foram sensibilizados e desafiados com OVA, após 4 e 24 horas, apresentaram resposta inflamatória na conjuntiva caracterizada pelo influxo de eosinófilos (Figuras 10B e C) e neutrófilos (Figura 11D), além da presença de vários mastócitos (Figuras 11B e C).

Os tratamentos farmacológicos com Dex e rGal-1 produziram diferentes efeitos na conjuntiva. Nos animais tratados com Dex, a lâmina própria das conjuntivas apresentou pouco influxo de leucócitos e mastócitos nos tempos de 4 e 24 horas (Figuras 10D e E; 11E e F). Já o efeito do tratamento com a rGal-1, curiosamente, foi associado a um influxo de eosinófilos para a conjuntiva (Figuras 10F e G) e de neutrófilos intravasculares (Figura 11G) nos dois tempos experimentais. Nesse grupo os mastócitos foram observados intactos e pouco frequentes no tecido conjuntivo (Figura 11G e H).

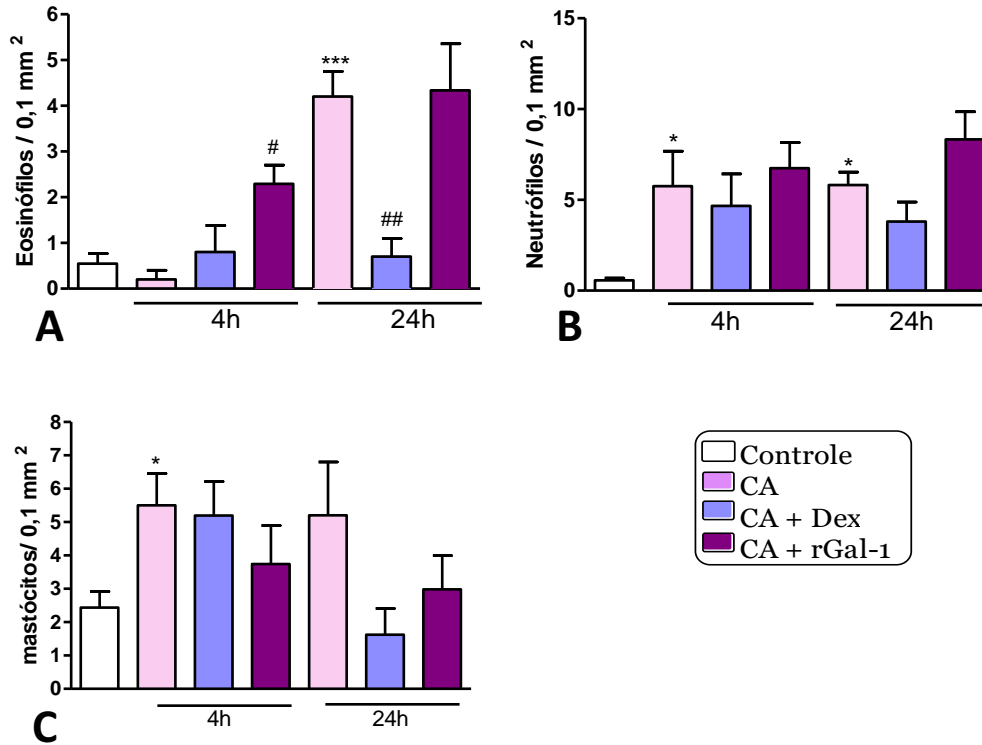
As análises quantitativas dos eosinófilos, neutrófilos e mastócitos nas conjuntivas dos animais confirmaram as observações histológicas. O modelo experimental de CA causou na fase inicial, 4 horas, aumento significativo de neutrófilos (Figura 12B) e mastócitos (Figura 12C), e na tardia, 24 horas, influxo de eosinófilos e neutrófilos (Figuras 12A e B) comparado ao controle. O tratamento com Dex mostrou melhor efeito anti-inflamatório no tempo experimental de 24 horas, produzindo redução significativa no número de eosinófilos (Figura 12A) e diminuição de mastócitos (Figura 12C) em relação ao grupo CA sem tratamento. Por outro lado, a administração de rGal-1 produziu aumento significativo de eosinófilos para essa membrana mucosa comparado ao grupo CA (Figura 12A) no tempo experimental de 4 horas e não alterou o número de neutrófilos nos períodos observados (Figura 12B). O efeito inibitório dessa lectina na conjuntiva foi mais evidente no número de mastócitos, embora a redução observada não tenha sido significativa em relação ao grupo CA após 4 e 24 horas (Figura 12 C).



**Figura 10. Análise histopatológica da conjuntiva bulbar.** [A] Olho controle. Conjuntiva bulbar constituída por epitélio estratificado cilíndrico a pavimentoso (Ep) e tecido conjuntivo frouxo (Tc) subjacente. Fibroblastos (cabeças de setas). [B, C] Após 4 e 24h da última instilação de OVA nos olhos dos animais observa-se uma resposta inflamatória caracterizada pela presença de eosinófilos (setas) no tecido conjuntivo. [D, E] Conjuntivas de animais tratados com dexametasona com aspecto semelhante à histologia do grupo controle. [F, G] Eosinófilos transmigrados (setas) para a conjuntiva bulbar em animais tratados com rGal-1, após 4 e 24h. Nos cantos superiores direitos das figuras B, C, F e G, detalhe de eosinófilos observados no tecido conjuntivo. Cortes de 4 $\mu$ m. Coloração: Hematoxilina e eosina. Barras: 10  $\mu$ m (A-F); 20  $\mu$ m (G); 5  $\mu$ m (detalhes das figuras B, C, F e G).



**Figura 11 Mastócitos na conjuntiva bulbar.** [A] Grupo Controle. Conjuntiva bulbar mostrando dois mastócitos (setas) com grânulos citoplasmáticos metacromáticos. [B-D] Grupo CA nas fases inicial (4h) e tardia (24h) da resposta alérgica. Presença de vários mastócitos (setas) e neutrófilos transmigrados (setas brancas) na lâmina própria da conjuntiva. Mastócitos (setas) observados nos grupos tratados com dexametasona (CA+Dex) [E, F] e rGal-1 (CA+rGal-1) [G, H] após 4 e 24h do último desafio com OVA. Leucócitos intravasculares (setas brancas) observados nas conjuntivas após tratamento com rGal-1 [H]. Cortes: 1  $\mu$ m. Coloração: Azul de Toluidina. Barras: 20  $\mu$ m.



**Figura 12. Quantificação de eosinófilos [A], neutrófilos [B] e mastócitos [C] na conjuntiva bulbar.** Os resultados representam as médias  $\pm$  S.E.M. do número de células por 0,1 mm<sup>2</sup> analisadas no olho direito dos animais (n = 5 animais/grupo). CA, grupo conjuntivite alérgica; CA+Dex, grupo CA tratado com Dex 4 e 24h; CA+rGal-1, grupo CA tratado rGal-1. \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001 vs. grupo controle; <sup>#</sup>P < 0,05; <sup>##</sup>P < 0,01 vs. grupo CA do tempo experimental correspondente.

#### 4.5. Quantificação dos níveis de citocinas e quimiocinas

As dosagens de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) e quimiocinas (RANTES, eotaxina e MCP-1) foram realizadas por painel multiplex, utilizando o equipamento Magpix. Verificamos o padrão dessas citocinas e quimiocinas nas respostas inflamatórias alérgicas local (olhos e fluido lacrimal) e sistêmica (linfonodos cervicais), avaliadas após 4 e 24 horas do desafio com OVA em camundongos Balb/c dos grupos tratados ou não com rGal-1 ou Dex, além do grupo controle.

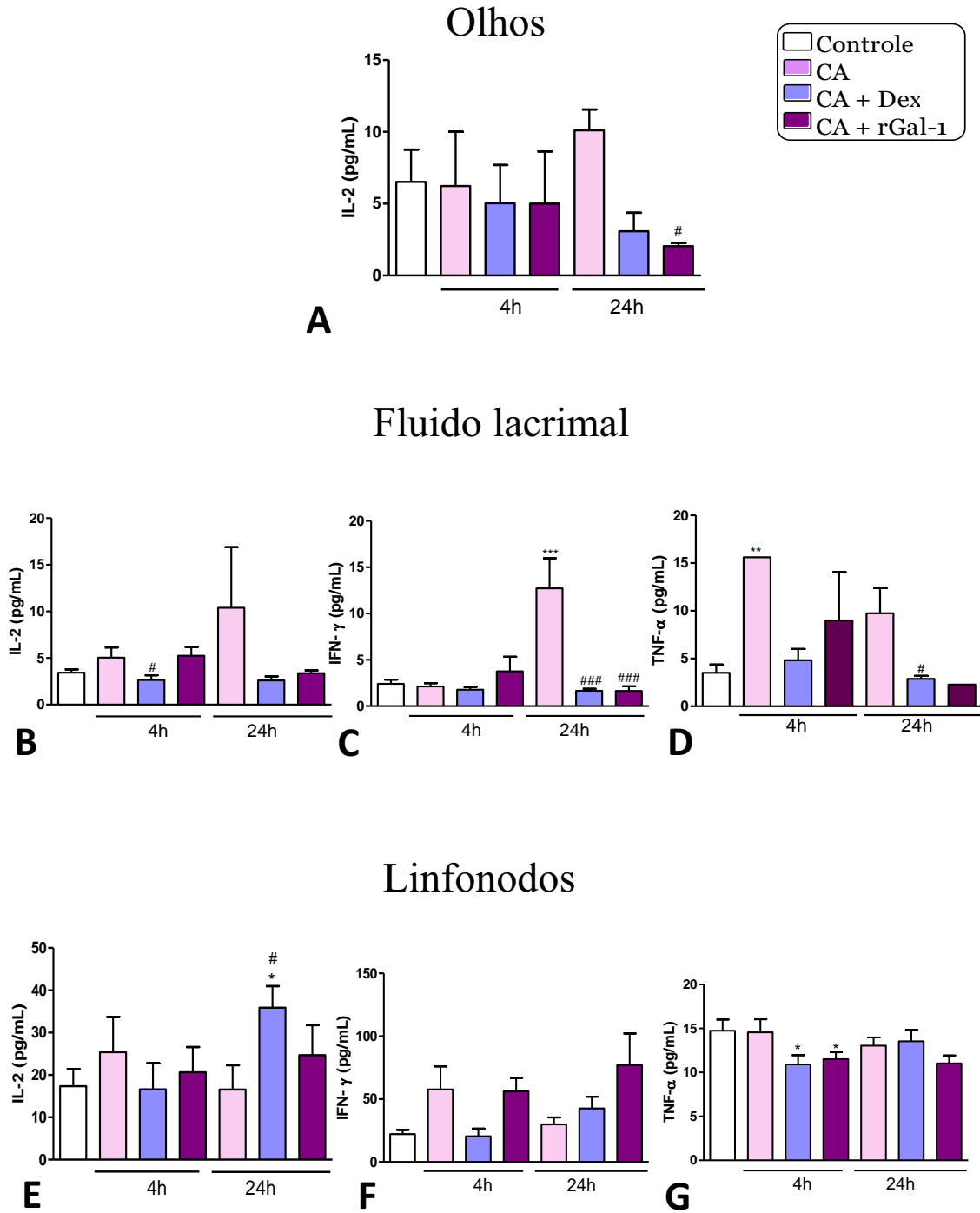
Inicialmente, analisamos as citocinas de perfil Th1 nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos dos animais (Figura 13). Na fase inicial da resposta alérgica, 4 horas, foi detectado aumento significativo de TNF- $\alpha$  no fluido lacrimal (Figura 13D) do grupo CA comparado ao grupo controle, enquanto nos linfonodos os tratamentos farmacológicos com Dex e rGal-1 diminuíram os níveis dessa citocina TNF- $\alpha$  (Figura 13G). Nesse período, a Dex induziu também diminuição significativa de IL-2 no fluido lacrimal em relação ao grupo CA (Figura 13B). Após 24 horas (fase tardia) aumento significativo de IFN- $\gamma$  foi detectado no fluido lacrimal do grupo CA comparado ao grupo controle e seu declínio nos grupos tratados com Dex e rGal-1 (Figura 13C). Ainda nesse mesmo tempo experimental, a rGal-1 causou diminuição de IL-2 nos olhos (Figura 13A), enquanto a Dex aumentou essa citocina nos linfonodos (Figura 13E) em relação aos grupos CA e controle. Além disso, o grupo tratado com Dex produziu no fluido lacrimal diminuição de TNF- $\alpha$  comparado ao grupo CA (Figura 13D). Os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos olhos não apresentaram alterações significantes (dados não mostrados).

Para as citocinas de perfil Th2, os olhos e fluido lacrimal apresentaram maiores alterações na fase tardia da resposta alérgica (Figura 14). Nos olhos aumento significativo de IL-4 foi detectado no grupo tratado com rGal-1 em relação ao grupo CA (Figura 14A), enquanto a IL-5 não demonstrou alterações de seus níveis entre os grupos (Figura 14B). No fluido lacrimal verificamos, após 24 horas, aumento do nível de IL-4 no grupo CA em relação ao grupo controle (Figura 14C). O tratamento com Dex reduziu os níveis dessa citocina no fluido lacrimal em relação ao grupo CA (Figura 14C), efeito também observado para IL-13 (Figura 14F). Os níveis de IL-5 e IL-10 no fluido lacrimal não apresentaram alterações significantes entre os diferentes grupos experimentais (Figuras 14D e E).

A análise das citocinas Th2 nos linfonodos demonstrou aumento significativo de IL-4, após 4 e 24 horas, em relação ao grupo controle (Figura 15A). Os tratamentos farmacológicos com Dex e rGal-1 reduziram significativamente essa citocina, após 4 horas, em relação ao grupo CA. Efeito semelhante foi observado para a IL-13 que mostrou diminuição dos seus níveis após os tratamentos na fase inicial, 4 horas, em relação ao grupo CA (Figura 15D). As citocina IL-5 e IL-10 não apresentaram alterações entre os grupos nesses órgãos (Figuras 15B e C).

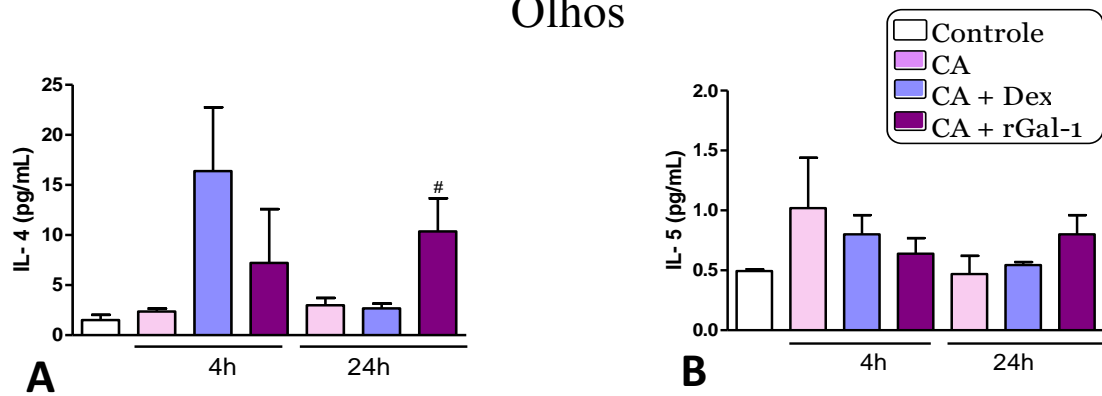
Na avaliação das quimiocinas (Figura 16) verificamos nos olhos aumento de MCP-1 nos grupos CA e tratados em relação ao grupo controle na fase inicial (Figura 16C), enquanto os níveis de eotaxina (Figura 16A) e RANTES (Figura 16B) não apresentaram alterações significantes. Semelhantemente, no fluido lacrimal não observamos alterações nos níveis de eotaxina, RANTES e MCP-1 (Figuras 16D-F). Nos linfonodos detectamos, na fase inicial, diminuição significativa de RANTES e MCP-1 no grupo tratado com Dex comparado aos grupos controle e CA (Figuras 16H e I) e, na fase tardia, aumento significativo de eotaxina no grupo CA em relação controle, seguido de e diminuição nos grupo tratados com Dex e rGal-1 (Figura 16G).



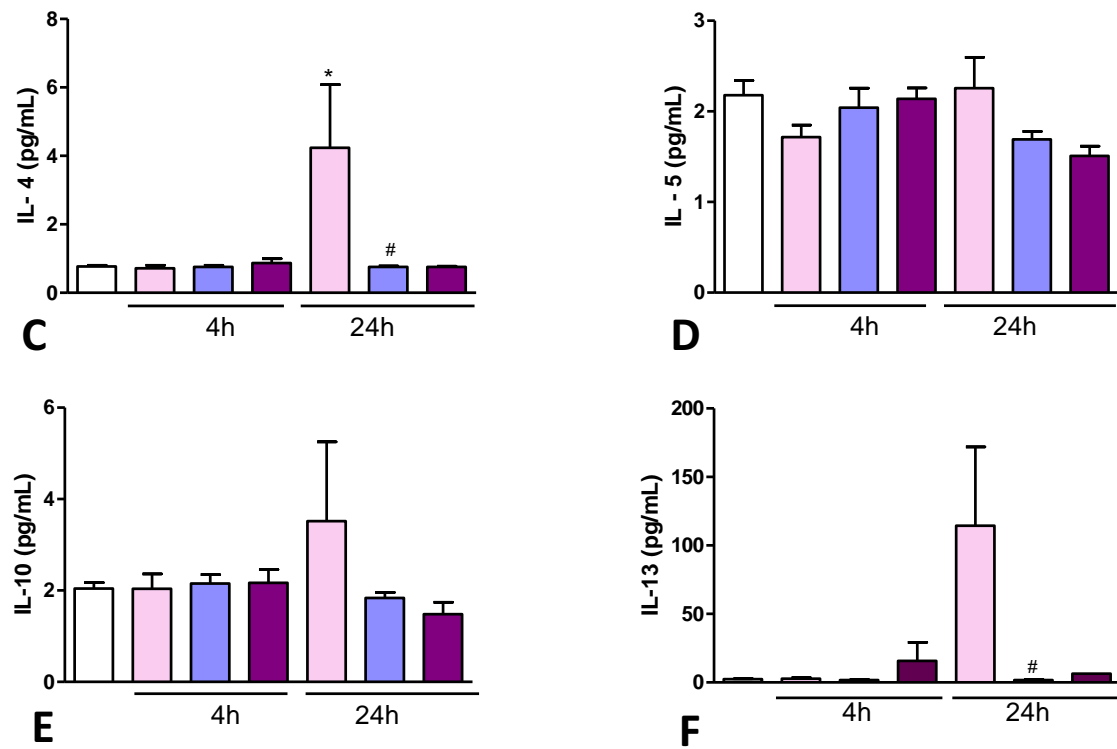


**Figura 13. Dosagem das citocina de perfil Th1 nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos. IL-2 [A, B, E]; IFN-γ [C, F]; TNF-α [D, G]. Os dados representam as médias ± S.E.M de citocinas (pg) por mL (n = 5 animais/grupo). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. controle; # p<0,05; ### p<0,001 vs. CA do tempo experimental correspondente.**

### Olhos

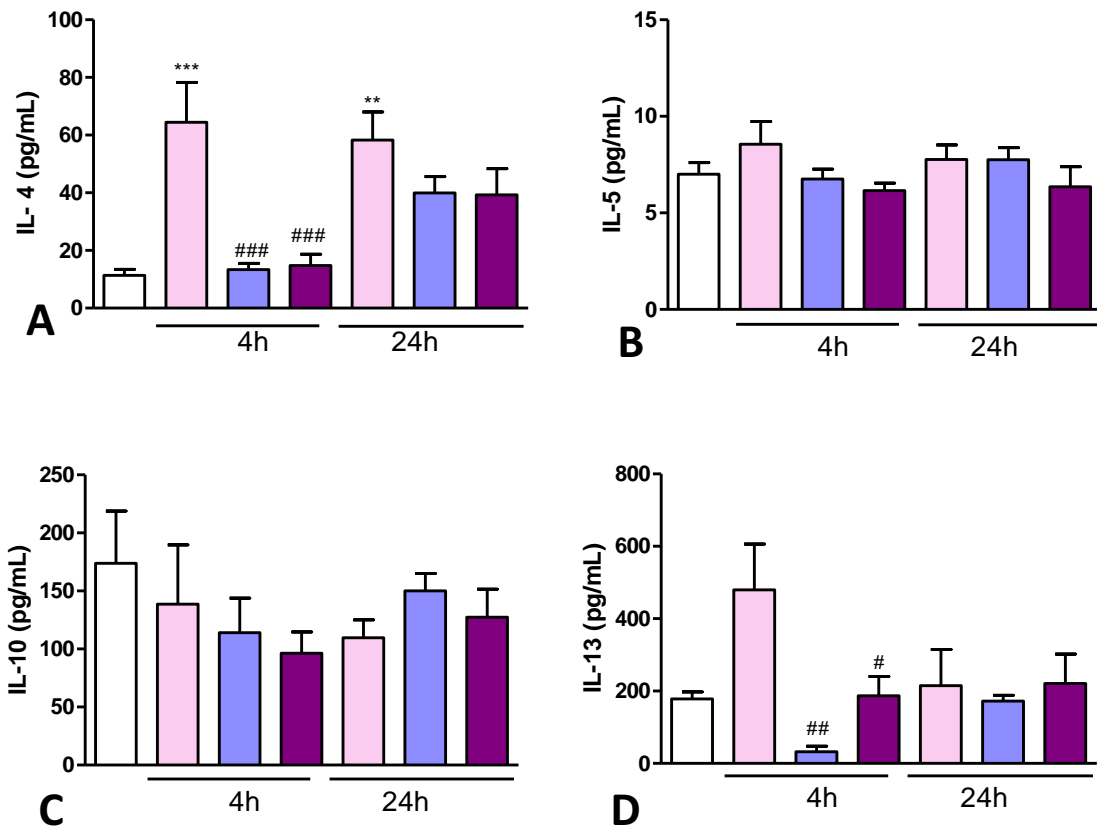
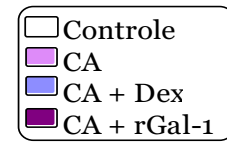


### Fluido lacrimal

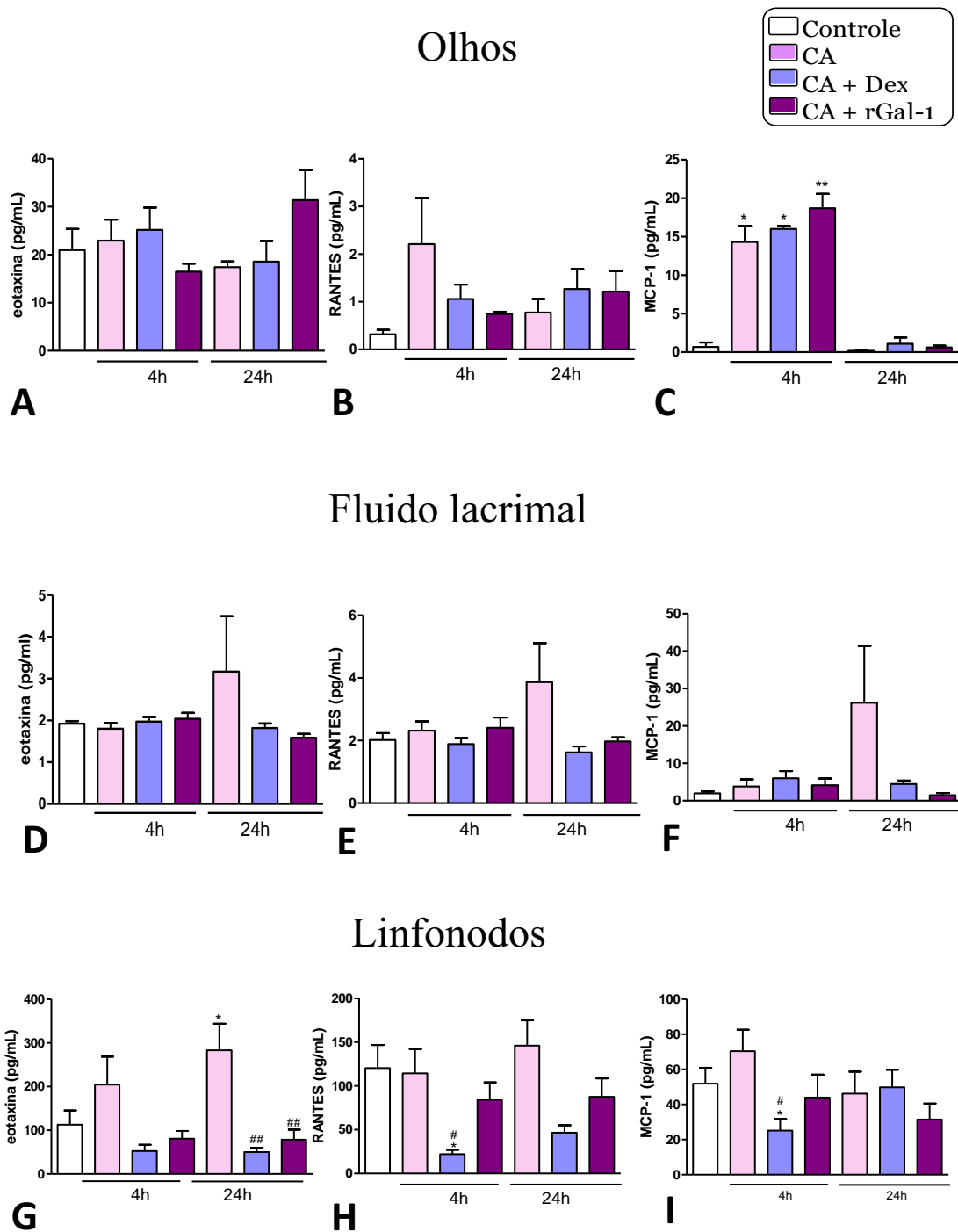


**Figura 14. Dosagem das citocinas de perfil Th2 nos olhos e fluido lacrimal. IL-4 [A, C]; IL-5 [B, D]; IL-10 [E] e IL-13 [F].** Os dados representam as médias  $\pm$  S.E.M de citocinas (pg) por ml (n = 5 animais/grupos). \* $p < 0,05$  vs. controle; <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. CA do tempo experimental correspondente.

Linfonodos



**Figura 15. Dosagem das citocinas de perfil Th2 nos linfonodos. IL-4 [A]; IL-5 [B]; IL-10 [C] e IL-13 [D].** Os dados representam as médias  $\pm$  S.E.M de citocinas (pg) por ml (n = 5 animais/grupos). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. controle; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. CA do tempo experimental correspondente.



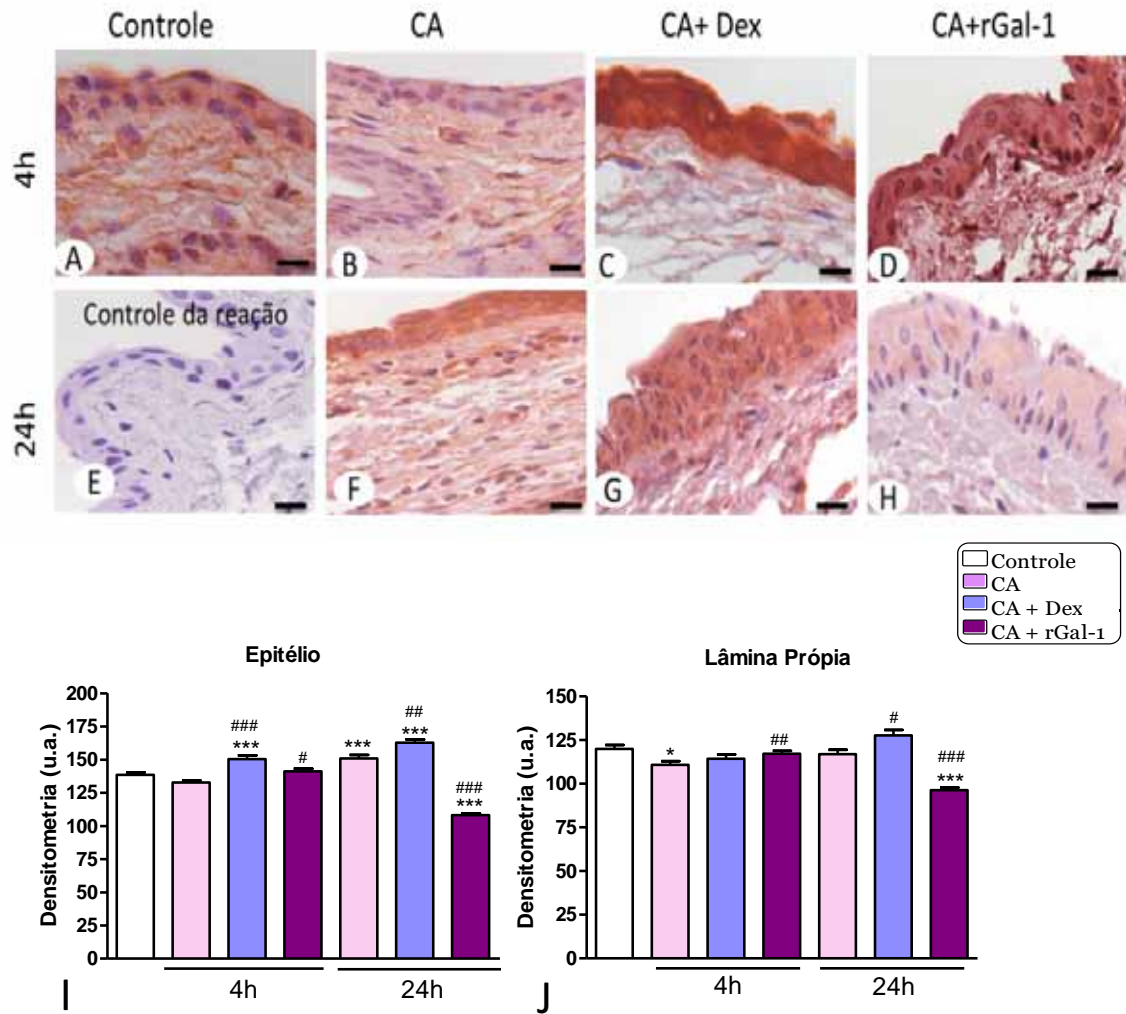
**Figura 16. Dosagem das quimiocinas nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos.** Eotaxina [A,D,G]; RANTES [B, E, H]; MCP-1 [C, F, I]. Os dados representam as médias  $\pm$  S.E.M de citocinas (pg) por ml (n = 5 animais/grupos). \*p<0,05; \*\*p<0,01; vs. controle do tempo experimental correspondente. #p<0,05; ## p<0,01 vs. CA do tempo experimental correspondente.

#### 4.6. Expressão da proteína Gal-1 endógena na conjuntiva bulbar

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas para definir a localização e expressão da Gal-1 endógena na conjuntiva dos animais controles, após indução de CA e tratados com rGal-1 ou Dex. Para imunolocalização dessa proteína, utilizamos o anticorpo policlonal *rabbit* anti-Gal-1.

A expressão da Gal-1 endógena foi detectada no epitélio e lâmina própria da conjuntiva no grupo controle (Figura 17A). Na fase inicial da resposta alérgica (4 horas), fraca imunorreatividade para Gal-1 endógena foi observada na lâmina própria (Figura 17B) em comparação ao controle (Figura 17A), enquanto níveis elevados foram observados no epitélio na fase mais tardia (24 horas) (Figura 17F). Já os tratamentos farmacológicos foram associados a intensa imunomarcagem no epitélio e lâmina própria (Figuras 17C e D), após 4 horas, em relação ao grupo não tratado (CA). Após 24 horas, a Dex induziu intensa imunorreatividade no epitélio e na lâmina própria da conjuntiva (Figura 17G), enquanto a administração de rGal-1 provocou fraca imunorreatividade em ambos compartimentos analisados (Figura 17H). Nenhuma imunomarcagem foi detectada nas amostras utilizadas como controle da reação (Figura 17E).

A análise densitométrica confirmou as observações histológicas, demonstrando no grupo sem tratamento (CA) diminuição significativa de Gal-1 na lâmina própria da conjuntiva (Figura 17J), após 4h, e aumento de sua expressão no epitélio (Figura 17I), após 24 horas. O tratamento com Dex causou altos níveis de Gal-1 no epitélio nos dois tempos experimentais (Figura 17I), enquanto na lâmina própria (Figura 17J) após 24 horas. A rGal-1 mostrou efeitos antagônicos, aumentando sua expressão endógena nos dois compartimentos analisados, após 4 horas, e reduzindo na fase tardia da resposta (Figuras 17I e J).



**Figura 17. Expressão da proteína Gal-1 endógena na conjuntiva bulbar.** Na fase inicial da resposta alérgica, fraca imunorreatividade da proteína endógena detectada na lâmina própria do grupo CA [B] comparado ao controle [A]. O tratamento com Dex aumentou os níveis dessa lectina no epitélio, após 4 [C] e 24h [G], e na matriz extracelular, após 24h [G], comparado ao grupo CA não tratado [B, F]. A administração exógena de rGal-1 produziu aumento de sua expressão endógena no epitélio e lâmina própria, após 4h [D], seguido de diminuição após 24h [H]. Controle da reação [E]. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 10µm. Análise densitométrica da expressão de Gal-1 no epitélio [I] e lâmina própria [J]. Dados (unidades arbitrárias, u.a.) representam as médias ± S.E.M. dos níveis de Gal-1. \*p< 0,05; \*\*\*p< 0,001 vs. controle; #p<0,05; #p<0,01; ###p<0,001 vs. CA do tempo experimental correspondente.



## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o efeito do tratamento farmacológico com a Gal-1 recombinante (rGal-1) na inflamação ocular, usando clássico modelo experimental de CA induzida pela OVA em camundongos (SHOJI et al., 2005; CHUNG; NAM; KWEON, 2009). Avaliamos a resposta inflamatória alérgica por escore clínico dos olhos, dosagem de IgE anti-OVA no plasma e análises histológicas e quantitativas das células inflamatórias no sangue e na conjuntiva bulbar após 4 e 24 horas do último desafio com OVA. Analisamos também, os níveis de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) e quimiocinas (RANTES, eotaxina e MCP-1) nos olhos, fluido lacrimal e linfonodos e, a expressão da proteína Gal-1 na conjuntiva bulbar dos animais nas diferentes condições experimentais.

Inicialmente, evidenciamos a eficácia do modelo de CA pela observação dos sinais clínicos da conjuntivite nos olhos e aumento nos níveis de IgE anti-OVA no plasma dos animais. Após 20 minutos do desafio com OVA por instilação direta no saco conjuntival, detectamos intensa hiperemia, edema de conjuntiva, edema de pálpebra e lacrimejamento no grupo CA, corroborando estudos prévios (SHOJI et al., 2005; CHUNG; NAM; KWEON, 2009). As análises histológicas e quantitativas de células inflamatórias caracterizaram a fase inicial da resposta alérgica por aumento significativo de neutrófilos e mastócitos na conjuntiva comparado aos animais não sensibilizados com OVA (controle). Na fase tardia, 24 horas, influxo significativo de eosinófilos foi verificado na conjuntiva, associado ainda ao elevado número de mastócitos e neutrófilos nessa membrana mucosa. Na quantificação de leucócitos do sangue observamos, na fase inicial, aumento no número de eosinófilos e neutrófilos no grupo CA, seguidos de diminuição, na fase tardia, possivelmente causada por sua intensa migração para a conjuntiva.

Nossos dados histopatológicos estão de acordo com as descrições na literatura que mostram intensa eosinofilia e neutrofilia na conjuntiva como características essenciais nesse modelo experimental induzido por diferentes antígenos, tais como OVA (SHOJI et al., 2005; CHUNG; NAM; KWEON, 2009), pólen (SOHN et al., 2003; FUKUSHIMA et al., 2010; ONO; LANE, 2011), ácaro (GIAVINA-BIANCHI; KALIL; RIZZO, 2008) e pelo de gato (MIYAZAKI et al., 2008). Ainda, vários trabalhos mostram papel significativo dos mastócitos na resposta imune do hospedeiro por meio da liberação dos seus mediadores biologicamente ativos, tais como histamina, TNF- $\alpha$ , IL-10 e as proteases triptase e quimase, que induzem mudanças rápidas e intensas nas



propriedades de adesão entre os leucócitos e endotélio (PEJLER et al., 2010; KALESNIKOFF; GALLI, 2010).

De fato, a importância dos mastócitos na indução da transmigração de neutrófilos e eosinófilos tem sido demonstrada em modelos de inflamação aguda (AJUEBOR et al., 1999), sistêmica (DA SILVA; GIROL; OLIANI, 2011) e alérgica (MIYAZAKI et al., 2008; FUKUDA et al., 2009). Dois desses estudos, usando método de depleção seletiva dos mastócitos pelo composto 48/80 mostraram, na cavidade peritoneal, diminuição do influxo de neutrófilos, após 4 horas, da indução de peritonite por zymosan (AJUEBOR et al., 1999), e no humor aquoso, após 24 horas, da indução de uveíte por lipopolissacarídeo (DA SILVA; GIROL; OLIANI, 2011), comparado aos animais com mastócitos não depletados. Ainda, outras investigações em modelo de CA induzida por pólen, demonstraram que camundongos deficientes para mastócitos, após desafio com pólen no saco conjuntival, não apresentaram sinais clínicos e eosinofilia na conjuntiva tão intensos como nos animais selvagens (MIYAZAKI et al., 2008; FUKUDA et al., 2009). Esse efeito foi revertido quando os animais deficientes foram repovoados com mastócitos, mostrando que essas células são essenciais na indução da resposta inicial à conjuntivite alérgica (sinais clínicos) e recrutamento de eosinófilos. Dessa maneira, em nosso modelo experimental de CA, possivelmente o aumento do número de mastócitos, na fase inicial, induz a alta migração de eosinófilos e neutrófilos observados na conjuntiva.

O tratamento farmacológico com Dex promoveu diminuição dos sinais clínicos da CA, assim como o recrutamento de células inflamatórias para a conjuntiva, especialmente na fase tardia da resposta alérgica onde ocorreu diminuição significativa de eosinófilos na conjuntiva, associada a números também reduzidos de neutrófilos e mastócitos em relação ao grupo CA. Já, nos leucócitos do sangue, a Dex não demonstrou efeitos significantes na quantificação dessas células. Nossos dados estão de acordo com outras investigações que mostraram diminuição do número de eosinófilos no tecido e dos sinais clínicos da conjuntivite em modelos de CA em camundongos (SHOJI et al., 2005) e porquinhos-da-índia (SOHN et al., 2003) induzidos por OVA e pólen, respectivamente. De fato, os corticosteroides agem inibindo a ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> suprimindo a produção de ácido araquidônico e de mediadores inflamatórios relacionados, restabelecendo a permeabilidade vascular inicial e diminuindo o influxo de leucócitos para os tecidos, constituindo um potente

medicamento utilizado no combate de doenças oculares inflamatórias (FRIEDLAENDER, 2011).

Caracterizado esse efeito anti-inflamatório da Dex em nosso modelo de CA, direcionamos nossos estudos para a compreensão dos efeitos provocados pelo tratamento farmacológico com a rGal-1 nos sinais clínicos da conjuntivite e no recrutamento de células inflamatórias. Em relação aos sinais clínicos, evidenciamos eficaz ação anti-inflamatória dessa lectina, com diminuição significativa dos sintomas da conjuntivite nos três dias observados (14<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup>). Considerando os mastócitos as principais células envolvidas no desencadeamento desses sintomas (MIYAZAKI et al., 2008; FUKUDA et al., 2009), verificamos em nosso trabalho que o tratamento com a rGal-1 foi associado a menor número dessas células na conjuntiva comparada aos animais não tratados (grupo CA), particularmente na fase mais tardia (24 horas). Resultados semelhantes foram observados em modelo de edema de pata em ratos, induzido pela injeção de fosfolipase A2 do veneno de abelha, no qual o pré-tratamento farmacológico com a Gal-1 reduziu o edema na pata dos animais e o número de mastócitos no tecido conjuntivo após 4 horas (RABINOVICH et al., 2000). Ainda, estudos realizados no nosso laboratório mostraram que os mastócitos expressam essa lectina em seus grânulos citoplasmáticos e seus níveis endógenos são modulados pela ação de glicocorticoides em humanos (SENA et al., 2006), na carcinogênese gástrica e desnervação mioentérica em ratos (ESTOFOLETE et al., 2011), mas não são alterados na resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina nesses roedores (GIL et al., 2006a). Dessa maneira, os mastócitos representam fontes importantes de Gal-1 para o tecido conjuntivo e, no modelo experimental de CA, a ação exógena da Gal-1 é essencial para reduzir a ativação dos mastócitos e regular o desencadeamento dos sinais clínicos dessa patologia.

Nosso estudo também demonstrou que a rGal-1 aumentou significativamente o número de monócitos do sangue periférico em relação aos animais controles, não tratados e aos tratados com Dex, após 4 horas. Resultados semelhantes foram observados em modelo clássico de peritonite induzida por zymosan, mostrando aumento significativo no número de células fagocitárias mononucleares no lavado peritoneal de camundongos tratados com rGal-1 quando comparado ao grupo não tratado após 24 horas (GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Esse dado evidencia o papel dessa proteína na quimiotaxia de monócitos por meio da ligação ao seu CRD (redução

de 65% na presença de lactose) e alteração das vias da quinase MAP, demonstrada por testes *in vitro* (MALIK et al., 2009).

Ainda, nas análises histopatológicas e quantitativas, a administração de rGal-1 nos animais causou na fase inicial, redução significativa de eosinófilos no sangue possivelmente ocasionada pela alta migração dessas células para a conjuntiva, efeito mantido na fase mais tardia. Os eosinófilos são células-chaves na resposta inflamatória alérgica e expressam a proteína Gal-1 cujos níveis endógenos não são modulados pela ação de glicocorticoides como demonstrado em estudos de polipose nasal em humanos (SENA et al., 2006). Ainda, ensaios *in vitro* evidenciaram aumento significativo da adesão de eosinófilos humanos em suportes recobertos pela Gal-1 comparados aos suportes recobertos com a molécula de adesão P-selectina (DELBROUCK et al., 2002). Por outro lado, a migração dessas células nos suportes recobertos por Gal-1 foi menor do que nos recobertos por P-selectina. Ainda, esses estudos mostraram que os eosinófilos em contato com a Gal-1 exógena, aumentam significativamente os níveis da proteína catiônica eosinofílica, sugerindo um papel dessa lectina na ativação desse tipo celular. Portanto, o papel exógeno da Gal-1 na inflamação alérgica envolve os processos de migração e ativação dos eosinófilos, que podem ser contrabalançados pela regulação dos mastócitos de forma antagônica.

Vários estudos indicam que o contrabalanceamento das respostas geradas pela produção de citocinas de perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-12) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) são importantes na regulação de doenças alérgicas. Estudos sugerem uma regulação cruzada de IL-4 e IFN- $\gamma$ , capazes de inibir respostas Th1 e Th2, respectivamente, fornecendo evidências da complexidade das interações Th1/Th2. Ainda, a migração de leucócitos no tecido inflamado é coordenada por uma rede de interação dessas citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (THEOFILOPOULOS et al., 2001; GOR; ROSE; GREENSPAN, 2003).

Esse balanço no perfil de citocinas Th1/Th2 foi demonstrado em nosso modelo experimental. Na fase inicial da resposta alérgica, 4 horas, o grupo CA mostrou aumento do nível de TNF- $\alpha$  (fluido lacrimal) e IL-4 (linfonodos). Na fase tardia, 24 horas, a CA induziu aumento na expressão de ambos os perfis de citocinas, IFN- $\gamma$  (fluido lacrimal) e IL-4 (fluido lacrimal e linfonodos). Esses dados corroboram outros trabalhos da literatura que mostraram aumento no perfil de citocinas Th1 e Th2 envolvendo modelo experimental de conjuntivite alérgica (LEONARDI et al., 2006;

FUKUSHIMA et al., 2006; GIAVINA-BIANCHI; KALIL; RIZZO, 2008; CHUNG et al., 2009; LI et al., 2011; FUKUDA et al., 2012).

Os tratamentos farmacológicos também demonstraram alterações nos dois perfis de citocinas. Na fase inicial, a rGal-1 e Dex reduziram significativamente a produção de IL-4 e IL-13 (Th2) nos linfonodos. Já, na fase tardia, produziram efeitos antagônicos na produção de IL-4 com diminuição, no fluido lacrimal, pela Dex e aumento, nos olhos, pela rGal-1, esse último corroborando com o alto número de eosinófilos observados na conjuntiva desse grupo. A administração de rGal-1 e Dex também alteraram o padrão Th1 diminuindo o nível de IL-2 (olhos e fluido lacrimal, respectivamente) e IFN- $\gamma$  (fluido lacrimal). O tratamento com Dex produziu ainda nos linfonodos aumento de IL-2 enquanto no fluido lacrimal redução de TNF- $\alpha$ , após 24 horas. Os efeitos regulatórios da Dex na expressão de citocinas Th2 têm sido relatados em modelos experimentais de asma induzida por OVA em camundongos (MA et al., 2013; SEO et al., 2013). Em ambos estudos, níveis reduzidos de IL-4 e IL-5 foram demonstrados no lavado broncoalveolar e pulmões de animais desafiados com OVA e tratados com Dex. Já para a Gal-1, os estudos mostram potente papel anti-inflamatório na inibição de citocinas de perfil Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12) em modelos experimentais de inflamação aguda (GIL; GULLO; OLIANI, 2011) e sistêmica (RABINOVICH et al., 1999; SANTUCCI et al., 2003; TOSCANO et al., 2006). Nas inflamações oculares esse efeito protetor da Gal-1 também foi demonstrado em modelos experimentais de respostas Th1, como uveíte (TOSCANO et al., 2006) e ceratite estromal (RAJASAGI et al., 2012). Nesse cenário, nosso estudo é o primeiro a demonstrar regulação negativa de citocinas Th2 pela Gal-1 em modelo de alergia ocular.

A avaliação das quimiocinas evidenciou alta resposta local e sistêmica no recrutamento celular pelo modelo de CA. A CA foi caracterizada pelo aumento de MCP-1 (olhos), após 4 horas, e de eotaxina (linfonodos), após 24 horas. Por outro lado, os tratamentos farmacológicos reduziram significativamente os níveis de eotaxina nos linfonodos. Ainda, a Dex diminuiu MCP-1 e RANTES nesse órgão. O papel dessas quimiocinas e aumento de sua expressão nas respostas alérgicas oculares tem sido demonstrado em diferentes estudos (OZAKI et al., 2003; MIYAZAKI et al., 2009; TOMINAGA et al., 2009). Um desses trabalhos usando modelo de CA induzida por pelo de gato, mostrou que camundongos deficientes para eotaxina reduziram as reações de hipersensibilidade imediata (MIYAZAKI et al., 2009). Em outro, a injeção subconjuntival de MCP-1 recombinante estimulou a desgranulação de mastócitos e o

recrutamento de monócitos/macrófagos (TOMINAGA et al., 2009). Ainda nesse estudo, o bloqueio de MCP-1 ou de seu receptor CCR2 pelo tratamento dos animais com anticorpo ou antagonista específico, respectivamente, suprimiu significativamente a indução dos sinais clínicos da conjuntivite, confirmando papel dessa quimiocina na desgranulação de mastócitos. Em conjunto, os dados demonstram importante papel inibitório sistêmico e local da Gal-1, sugerindo essa lectina como alvo promissor para estudos de doenças alérgicas de hipersensibilidade tardia (tipo IV).

Finalmente, analisamos a expressão da proteína Gal-1 na conjuntiva em condições fisiológicas normais (grupo controle), submetidos à inflamação alérgica induzida por OVA (4 e 24 horas) sem tratamento, ou tratados com Dex ou rGal-1. Inicialmente detectamos a expressão da Gal-1 nas células epiteliais e lâmina própria da conjuntiva, confirmando dados da literatura que mostraram a expressão dessa lectina no segmento anterior do olho humano (FAUTSCH; SILVA; JOHNSON, 2003).

No modelo de CA, após 4 horas, ocorreu diminuição significativa na expressão da Gal-1 endógena na lâmina própria da conjuntiva comparado ao grupo controle, seguida de aumento no epitélio na fase tardia da resposta. 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 e altos após 24 horas (GIL et al., 2006a). Portanto, a diminuição dos níveis endógenos da Gal-1 na lâmina própria da conjuntiva durante a CA possivelmente favorece a transmigração leucocitária, enquanto as células epiteliais representam uma fonte potencial dessa lectina para os tecidos.

Em nossas análises imuno-histoquímicas, ressaltamos que o tratamento com a Gal-1 exógena modulou de forma antagônica seus níveis endógenos nos dois tempos experimentais analisados. Após 4 horas, epitélio e lâmina própria apresentaram aumento significativo de Gal-1 endógena seguida, de diminuição após 24 horas. A inibição da expressão endógena da Gal-1 na conjuntiva provavelmente ocorreu como mecanismo de *feedback* negativo pela adição de seu recombinante. Nos grupos tratados pela Dex, a expressão endógena de Gal-1 aumentou significativamente nos dois compartimentos analisados da conjuntiva, epitélio e lâmina própria, principalmente após 24 horas. Investigações prévias em pólipos nasais, incluindo as do nosso laboratório, também mostraram a modulação positiva do RNAm e da proteína Gal-1 após tratamento com glicocorticoides (budesonida e betametasona), particularmente nos tecidos epitelial e conjuntivo (DELBROUCK et al., 2002; SENA et al., 2006; FERNANDES et al., 2010).

Os autores associaram a modulação positiva da Gal-1 com a diminuição da transmigração de eosinófilos para os tecidos (DELBROUCK et al., 2002). Assim, na resposta inflamatória induzida pela CA, os efeitos anti- ou pró-migratórios sobre os leucócitos estão positivamente associados com os altos e baixos níveis da Gal-1 na lâmina própria, respectivamente, sugerindo um importante papel para essa lectina na adesão leucócito-matriz extracelular na alergia ocular.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

1. O modelo experimental de CA, induzida por OVA nos camundongos Balb/c, causa de forma eficaz a manifestação dos sinais clínicos característicos da doença (edema e hiperemia de conjuntiva, edema de pálpebra e lacrimejamento) e aumenta os níveis séricos de IgE anti-OVA em comparação ao controle.
2. Os tratamentos farmacológicos com rGal-1 e Dex são eficazes na diminuição dos sinais clínicos nos olhos (edema e hiperemia de conjuntiva, edema de pálpebra e lacrimejamento), induzidos pelo modelo de CA após 20 minutos do desafio com OVA, comparados aos animais sem tratamento. Ambos tratamentos diminuem significativamente os níveis de IgE anti-OVA, após 4 horas, comparado ao grupo CA.
3. Após 4 horas do último desafio com OVA (grupo CA), as análises histopatológicas e quantitativas das células inflamatórias revelam aumento significativo de neutrófilos (circulantes e extravasados) e mastócitos para a conjuntiva. Enquanto, após 24 horas, intensa neutrofilia e eosinofilia caracterizam a fase tardia da resposta inflamatória.
4. A rGal-1 aumenta significativamente os monócitos circulantes, após 4 horas do desafio, e diminui os eosinófilos circulantes, após 4 e 24 horas, comparados aos animais sem tratamento. Em contraposição, na conjuntiva bulbar, a administração de rGal-1 aumenta significativamente o número de eosinófilos na fase inicial (4 horas), e reduz o número de mastócitos na fase tardia (24 horas).
5. A ação anti-inflamatória da Dex é caracterizada na fase tardia da resposta pela redução significativa do número de eosinófilos na conjuntiva e diminuição de mastócitos em comparação aos animais não tratados.
6. A CA induz elevados níveis de citocinas Th1 (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4) no fluido lacrimal em comparação ao grupo controle. Ainda, nos olhos provoca aumento de MCP-1, e nos linfonodos, aumento de eotaxina e IL-4.
7. A rGal-1 e Dex diminuem significativamente a produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) no fluido lacrimal, Th2 (IL-4 e IL-13) e eotaxina nos linfonodos em comparação ao grupo sem tratamento CA.



8. Antagonicamente, a administração de rGal-1 inibe os níveis de IL-2 e aumenta os de IL-4 nos olhos.
9. Níveis reduzidos de MCP-1 e RANTES são detectados nos linfonodos dos animais tratados com Dex em relação aos grupos controle e CA.
10. A expressão endógena da Gal-1 diminui significativamente na lâmina própria da conjuntiva, após 4 horas da indução da CA, e aumenta no epitélio, após 24 horas.
11. Os níveis endógenos de Gal-1 são modulados positivamente no epitélio e lâmina própria da conjuntiva pelo tratamento com a Dex, particularmente na fase tardia da resposta alérgica.
12. A administração de Gal-1 exógena modula seus níveis endógenos provocando aumento no epitélio e lâmina própria após 4 horas e, posteriormente, diminuições nesses dois compartimentos após 24 horas.

## REFERÊNCIAS

---

## 7. REFERÊNCIAS

- AJUEBOR, M. N.; DAS, A. M.; FLOWER, R. I.; SZABÓ, C.; PERRETTI, M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cell in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for a loop involving endogenous IL-10. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 162, n. 3, p. 1685-1691, Feb 1999. ISSN 00221767.
- 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. **European Journal of Immunology**, Weinhein, v. 28, n. 8, p. 2311-2319, Aug 1998. ISSN 0014-2980.
- BUNDOC, V. G.; KEANE-MYERS, A. IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. **Experimental Eye Research**, London, v. 85, n. 4, p. 575-579, Oct 2007. ISSN 0014-4835.
- CHUNG, S. H.; NAM, K. H.; KWEON, M. N. Staphylococcus aureus accelerates an experimental allergic conjunctivitis by Toll-like receptor 2-dependent manner. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 131, n. 1, p. 170-177, Apr 2009. ISSN 1521-7035.
- COOPER, D.; NORLING, L. V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83, n. 6, p. 1459-1466, Jun 2008. ISSN 0741-5400.
- COOPER, D.; ILARREGUI, J. M.; PESOA, S. A.; CROCI, D. O.; PERRETTI, M.; RABINOVICH, G. A. Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. **Methods in Enzymology**, New York, v. 480, p. 199-244, 2010. ISSN 1557-7988.
- DAMAZO, A. S.; YONA, S.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, n. 7, p. 4410-4418, Apr 2006. ISSN 0022-1767.
- DA SILVA, P. S.; GIROL, A. P.; OLIANI, S. M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 17, p. 1310-1319, 2011. ISSN 1090-0535.
- DELBROUCK, C., DOYEN, I., BELOT, N.; DECAESTECKER, C., GHANOONI, R., DE LAVAREILLE, A., KALTNER, H., CHOUFANI, G., DANGUY, A., VANDENHOVEN, G., GABIUS, H. J., HASSID, S., KISS, R. L. Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. **Laboratory investigation**, Baltimore, v. 82, n. 2, p.147-158, Feb 2002. ISSN 0023-6837.
- DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. **Roitt - Fundamentos de Imunologia**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 552p.
- DE OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, São Paulo, v. 61, n. 2, p.255-265, Mar-Abr 2011. ISSN 00347064.

- DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyt Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, New York, v. 29, n. 6, p. 313-326, Jun 2009. ISSN 10799907.
- ESTOFOLETE, C. F.; ZUCOLOTO, S.; OLIANI, S. M.; POLLI-LOPES, A. C.; GIL, C. D. Myenteric Denervation Downregulates Galectin-1 and-3 Expression in Gastric Carcinogenesis. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 56, n. 6, p. 1637-1644, Jun 2011. ISSN 1573-2568.
- FAUTSCH, M. P.; SILVA, A. O.; JOHNSON, D. H. Carbohydrate binding proteins galectin-1 and galectin-3 in human trabecular meshwork. **Experimental Eye Research**, London, v. 77, n. 1, p. 11-16, Jul 2003. ISSN 0014-4835.
- FERNANDES, A. M.; BABETO, E.; RAHAL, P.; PROVAZZI, P. J.; HIDALGO, C. A.; ANSELMO-LIMA, W.T. Expression of genes that encode the annexin-1 and galectin-1 proteins in nasal polyposis and their modulation by glucocorticoid. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 2, p. 213-218, Mar-Apr 2010. ISSN 1808-8694.
- FORTE, W. C. N. **Imunologia do básico ao aplicado**. 2<sup>a</sup> ed. Porto alegre: Artemed, 2007. 364 p.
- FRIEDLAENDER, M. H. Ocular allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v. 11, n. 5, p. 477-482, Oct 2011. ISSN 1528-4050.
- FUKUDA, K; OHBAYASHI, M; MOROHOSHI, K; ZHANG, L.; LIU, F. T.; ONO, S. J. Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 124, n. 4, p. 827-833, Oct 2009. ISSN 0091-6749.
- FUKUDA, K.; KUO, C. H.; MOROHOSHI, K.; LIU, F. T; ONO, S. J. The murine CCR3 receptor regulates both eosinophilia and hyperresponsiveness in IgE-mediated allergic conjunctivitis. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 96, n. 8, p. 1132-1136, Aug 2012. ISSN 0007-1161.
- FUKUSHIMA, A.; SUMI, T.; FUKUDA, K.; KUMAGAI, N.; NISHIDA, T.; TSURU, E.; UENO, H. Analysis of the interaction between IFN-gamma and IFN-gammaR in the effector phase of experimental murine allergic conjunctivitis. **Immunology letters**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 119-124, Nov 2006. INSS 0165-2478.
- FUKUSHIMA, A.; ISHIDA, W.; OJIMA, A.; KAJISAKO, M.; SUMI, T.; YAMADA, J; TSURU, E.; MIYAZAKI, J-I ; TOMINAGA, A.; YAGITA, H. Participation of CD11b and F4/80 Molecules in the Conjunctival Eosinophilia of Experimental Allergic Conjunctivitis. **Internacional Archives of Allergy and Immunology**, Switzerland, v. 151, n. 2, p. 129-136, Set 2010. ISSN1018-2438.
- FULCHER, J. A.; HASHIMI, S. T.; LEVRONEY, E. L.; PANG, M.; GURNEY, K. B.; BAUM, L. G.; LEE, B. Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177, n. 1, p. 216-226, Jul 2006. ISSN 0022-1767.
- GERALDINE, M.; CHONG NETO, H. J.; RIEDI, C. A.; ROSÁRIO, N. A Epidemiology of ocular allergy and co-morbidities in adolescents. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 327-420, Jul-Ag 2013. ISSN1678-4782.

- GIAVINA-BIANCHI, P.; KALIL, J.; RIZZO, L. V. Development of an animal model for allergic conjunctivitis: influence of genetic factors and allergen concentration on immune response. **Acta Ophthalmologica**, Oxford, v. 86, n. 6, p. 670-675, Set 2008. ISSN 1755-3768.
- GIL, C. D.; COOPER, D.; ROSIGNOLI, G.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflammation Research: official journal of European Histamine Research Society**, Basel, v. 55, n. 3, p. 99-107, Mar 2006a. ISSN 1023-3830.
- GIL, C. D.; LA, M.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biology Internacional**, London, v. 30, n. 4, p. 338-344, Apr 2006b. ISSN 1065-6995.
- GIL, C. D.; GULLO, C. E.; OLIANI, S. M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madison, v. 4, n. 1, p. 74-84, Dec 2010. ISSN 1936-2625.
- GOR, D.O.; ROSE, N. R.; GREENSPAN, N. S. TH1-TH2: a procrustean paradigm. **Nature Immunology**, New York, v. 4, n. 6, p. 503-505, Jun 2003. ISSN 503-505.
- GRONEBERG, D. A.; BIELORY, L.; FISCHER, A.; BONINI, S.; WAHN, U. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. **Allergy**, Copenhagen, v. 58, n. 11, p. 1101-1113, Nov 2003. ISSN 0105-4538.
- HOANG-XUAN, T.; BAUDOIN, C.; CREUZOT-GARCHER, C. **Inflammatory Diseases of the Conjunctiva**. 1<sup>st</sup> ed. Marseille: Rapport Annuel, Marseille, 2001, 297p.
- HOKAMA, A.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 33, p. 5133-5137, Sep 2008. ISSN 1007-9327.
- ILARREGUI, J. M.; CROCI, D. O.; BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; SALATINO, M.; VERMEULEN, M. E.; GEFFNER, J. R.; RABINOVICH, G. A. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. **Nature Immunology**, New York, v. 10, n. 9, p. 981-991, Sep 2009. ISSN 1529-2916.
- IRKEC, M. T.; BOZKURT, B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 5, p. 534-539, Oct 2012. ISSN 1528-4050.
- KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. Anaphylaxis: mechanisms of mast cell activation. **Chemical Immunology and Allergy**, New York, v. 95, p. 45-66, Jun 2010. ISSN 1660-2242.
- LA, M.; CAO, T. V.; CERCHIARO, G.; CHILTON, K.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; OLIANI, S. M.; CHERNAJOVSKY, Y.; PERRETTI, M. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 163, n. 4, p. 1505-1515, Oct 2003. ISSN 0002-9440.
- LA ROSA, M.; LIONETTI, E.; REIBALDI, M.; RUSSO, A.; LONGO, A.; LEONARDI, S.; TOMARCHIO, S.; AVITABILE, T.; REIBALDI, A. Allergic conjunctivitis: a

- comprehensive review of the literature. **Italian Journal of Pediatrics**, London, v. 39, Mar 2013. ISSN 1824-7288.
- LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, Norwell, v. 19, n. 7-9, p. 433-440, 2004. ISSN 0282-0080.
- LEONARDI, A.; CURNOW, S. J.; ZHAN, H.; CALDER, V. L. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. **Clinical and experimental allergy**, v. 36, n. 6, p. 777-784, 2006. ISSN 0954-7894.
- LI, D. Q.; ZHANG, L.; PFLUGFELDER, S. C.; DE PAIVA, C. S.; ZHANG, X.; ZHAO, G.; ZHENG, X.; SU, Z.; QU, Y. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 128, n. 6, p. 1318-1325, Dec 2011. ISSN 0091-6749.
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1183, p. 158-82, Jan 2010. ISSN 1749-6632.
- MA, C.; MA, Z.; LIAO, X. L.; LIU, J.; FU, Q.; MA, S. Immunoregulatory effects of glycyrrhizic acid exerts anti-asthmatic effects via modulation of Th1/Th2 cytokines and enhancement of CD4 (+) CD25 (+) Foxp3+ regulatory T cells in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Laurence, v. 148, n. 3, p. 755-762, Jul 2013. ISSN 0378-8741.
- MAGONE, M. T.; CHAN, C. C.; RIZZO, L. V.; KOZHICH, A. T.; WHITCUP, S. M. A novel murine model of allergic conjunctivitis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 87, n. 1, p. 75-84, Apr 1998. ISSN 0090-1229.
- MALIK, R. K.; GHURYE, R. R.; LAWRENCE, W. D. J.; STEWART, H. J. Galectin-1 stimulates monocyte chemotaxis via the p 44/42 MAP kinase pathway and a pertussis toxin-sensitive pathway. **Glycobiology**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1402-1407, Dec 2009. ISSN 1460-2423.
- MARBACK, P. M. F.; DE FREITAS, D.; PARANHOS JUNIOR, A.; BELFORT JUNIOR, R. Epidemiological and clinical features of allergic conjunctivitis in a reference center. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 312-6, Mar-Apr 2007. ISSN 0004-2749.
- MIYAZAKI, D.; TOMINAGA, T.; YAKURA, K.; KUO, C-H.; KOMATSU, N.; INOUE, Y.; ONO, S. J. Conjunctival mast cell as a mediator of eosinophilic response in ocular allergy. **Molecular Vision**, Atlanta, v.14, p. 1525-1532, Ag 2008. ISSN 1090-0535.
- MIYAZAKI, D.; NAKAMURA, T.; OHBAYASHI, M.; KUO, C. H.; KOMATSU, N.; YAKURA, K.; TOMINAGA, T.; INOUE, Y.; HIGASHI, H.; MURATA, M.; TAKEDA, S.; FUKUSHIMA, A.; LIU, F. T.; ROTHENBERG, M. E.; ONO, S. J. Ablation of type I hypersensitivity in experimental allergic conjunctivitis by eotaxin-1/CCR3 blockade. **International Immunology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 187-201, Feb 2009. ISSN 0953-8178.
- NORLING, L. V.; SAMPAIO, A. L.; COOPER, D.; PERRETTI, M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. **FASEB Journal : official publication of the Federation of American**, Bethesda, v. 22, n. 3, p. 682-690, Mar 2008. ISSN 1530-6860.

- OFFIAH, I.; CALDER, V. L. Immune mechanisms in allergic eye diseases: what is new ? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v. 9, n. 5, p. 477-481, Oct 2009. ISSN 1528-4050.
- ONO, S. J.; LANE, K. Comparison of effects of alcaftadine and olopatadine on conjunctival epithelium and eosinophil recruitment in a murine model of allergic conjunctivitis. **Drug Design, Development and Therapy**, Auckland, v. 8, n. 5, p. 77-84, Feb 2011. ISSN 1177-8881.
- OZAKI, A.; FUKUSHIMA, A.; FUKATA, K.; UENO, H. Mast-cell activation augments the late phase reaction in experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, New York, n. 5, p. 392-402, May 2003. ISSN 0721-832.
- PACHARN, P.; VICHYANOND, P. Immunomodulators for conjunctivitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v. 13, n. 5, p. 550-557, Oct 2013. ISSN 1528-4050.
- PAULSEN, F. P.; BERRY, M. S. Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, Germany, v. 4, n. 1, May 2006. INSS 0079-6336.
- PEJLER, G.; RÖNNBERG, E.; WAERN, I.; WERNERSSON, S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 115, n. 24, p. 4981-4990, Mar 2010. ISSN 0006-4971.
- PELIKAN, Z. **Conjunctivitis - A Complex and Multifaceted Disorders**. Rijeka: InTech, 2011. 246p.
- RABINOVICH, G. A.; IGLESIAS, M. M.; MODESTI, N. M.; CASTAGNA, L. F.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; RIERA, C. M.; SOTOMAYOR, C. E. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, n. 10, p. 4831-4840, May 1998. ISSN 0022-1767.
- RABINOVICH, G. A.; DALY, G.; DREJA, H.; TAILOR, H.; RIERA, C. M.; HIRABAYASHI, J.; CHERNAJOVSKY, Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 190, n. 3, p. 385-398, Aug 1999. ISSN 0022-1007.
- RABINOVICH, G. A.; SOTOMAYOR, C. E.; RIERA, C. M.; BIANCO, I.; CORREA, S. G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30, n. 5, p. 1331-1339, May 2000. ISSN 0014-2980.
- RABINOVICH, G. A.; BAUM, L. G.; TINARI, N.; PAGANELLI, R.; NATOLI, C.; LIU, F. T.; IACOBELLI, S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 313-20, Jun 2002. ISSN 1471-4906.
- RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. **Immunity**, Cambridge, v. 36, n. 3, p. 322-335, Mar 2012. ISSN 1074-7613.

- RAJASAGI, N. K.; SURYAWANSHI, A.; SEHRAWAT, S.; REDDY, P. B.; MULIK, S.; HIRASHIMA, M.; ROUSE, B.T. Galectin-1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunopathological lesions. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 188, n. 9, p. 4631-4643, May 2012. ISSN 0022-1767.
- READ, R. W.; YU, F.; ACCORINTI, M.; BODAGHI, B.; CHEE, S. P.; FARDEAU, C.; GOTO, H.; HOLLAND, G. N.; KAWASHIMA, H.; KOJIMA, E.; LEHOANG, P.; LEMAITRE, C.; OKADA, A. A.; PIVETTI-PEZZI, P.; SECCHI, A.; SEE, R. F.; TABBARA, K. F.; USUI, M.; RAO, N. A. Evaluation of the effect on outcomes of the route of administration of corticosteroids in acute Vogt-Koyanagi-Harada disease, **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 142, n. 1, p. 119-124, Jul 2006. ISSN 0002-9394.
- ROSARIO, N.; BIELORY, L. Epidemiology of allergic conjunctivitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hangerstown, v. 11, n. 5, p. 471-476, Out 2011. ISSN 1528-4050.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia - em correlação com biologia celular e molecular. Texto e Atlas**. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1008p.
- ROSENBAUM, J. T. Future for biological therapy for uveitis. **Current Opinion in Ophthalmology**, Philadelphia, v. 21, n. 6, p. 473-477, Nov 2010. ISSN 1531-7021.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J. **Immunology**, 4º ed. Rio de Janeiro: Manole, 1997.
- SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; CAMMILLERI, F.; SERVILLO, G.; FEDERIC, B.; MORELLI A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, Baltimore, v. 31, n. 2, p. 399-406, Feb 2000. ISSN 0270-9139.
- SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; RUBINSTEIN, N.; MENCARELLI, A.; PALAZZETTI, B.; FEDERICI, B.; RABINOVICH, G. A.; MORELLI, A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, Baltimore, 124, n. 5, p. 1381-1394, May 2003. ISSN 0016-5085.
- SENA, A. A. S.; PROVAZZI, P. J. S.; FERANDES, M.; CURY, P. M.; RAHAL, P.; OLIANI, S. M. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n.10, Oct 2006. ISSN 0954-7894.
- SEO, J. W.; CHO, S. C.; PARK, S. J.; LEE, E. J.; LEE, J. H.; HAN, S. S.; PYO, B. S.; PARK, D. H.; KIM, B. H. 1'-Acetoxychavicol acetate isolated from *Alpinia galanga* ameliorates ovalbumin-induced asthma in mice. **PloS One**, São Francisco, v. 8, n. 2, Feb 2013. ISSN 1932-6203.
- SHOJI, J.; SAKIMOTO, T.; MUROMOTO, K.; INADA, N.; SAWA, M.; RA, C. Comparison of topical dexamethasone and topical FK506 treatment for the experimental allergic conjunctivitis model in BALB/c mice. **Japanese Journal Ophthalmology**, Tokyo, v. 49, n. 3, p. 205-210, May-Jun 2005. ISSN 0021-5155.
- SOHN, J.; KIM, T. I.; YOON, Y. H.; KIM, J. Y.; KIM, S. Y. Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 111, n. 1, p. 121-128, Jan 2003. ISSN 0021-9738.



- STERN, M. E.; SIEMASKO, K. F.; NIEDERKORN, J. Y. The Th1/Th2 paradigm in ocular allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v. 5, n. 5, p. 446-450, Oct 2005. ISSN 1528-4050.
- TAKEDA, K.; GELFAND, E. W. Mouse models of allergic diseases. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 21, n.6, Dec 2009. INSS 09527915.
- THEOFILOPOULOS, A. N.; KOUNDOURIS, S.; KONO, D. H.; LAWSON, B. R. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. **Arthritis research**, London, v. 3, n. 3, p. 136-141, Feb 2001. INSS 14659905.
- TOMINAGA, T.; MIYAZAKI, D.; SASAKI, S.; MIHARA, S.; KOMATSU, N.; YAKURA, K.; INOUE, Y. Blocking Mast Cell-Mediated Type I Hypersensitivity in Experimental Allergic Conjunctivitis by Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCR2. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 50, n. 11, p. 5181-5188, Nov 2009. ISSN 0146-0404.
- TOSCANO, M. A.; COMMODARO, A. G.; ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; LIBERMAN, A.; SERRA, H. M.; HIRABAYASHI, J.; RIZZO, L. V.; RABINOVICH, G.A. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, n. 10, p. 6323-6332, May 2006. ISSN 0022-1767.
- ZUÑIGA, E.; RABINOVICH, G. A.; IGLESIAS, M. M.; GRUPPI, A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 70, n. 1, p. 73-79, Jul 2001. ISSN 0741-5400.



Immunomodulatory effects of galectin-1 on IgE-mediated allergic conjunctivitis model

Running title: **Galectin-1 in ocular allergy**

Mello-Bochi, C. B. <sup>1</sup>; Ramos, L. <sup>2</sup>; Gimenes, A. D. <sup>2</sup>; Andrade, T. R. <sup>2</sup>; Oliani, S. M. <sup>1</sup> and Gil, C. D. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>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>2</sup>Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil, 04023-900.

Corresponding author. Cristiane Damas Gil. Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo - UNIFESP, Rua Botucatu 740, Ed. Lemos Torres – 3º andar, 04023-900, São Paulo, SP, Brazil, Telephone: +55 11 5576-4268, E-mail: cristiane.gil@unifesp.br

## ABSTRACT

**Background:** Galectin-1 (Gal-1) can regulate the inflammatory response through leukocyte recruitment, multiple cytokine release and mast cell degranulation, but its role in allergic ocular inflammation has not been explored. Here, we evaluated the therapeutic potencial of Gal-1 in ocular allergy using a model of ovalbumin (OVA)-induced allergic conjunctivitis (AC).

**Methods:** OVA-immunized BALB/c male mice were challenged with eye drops containing OVA on days 14-16 with a subset of animals pretreated intraperitoneally with the recombinant Gal-1 (rGal-1) or dexamethasone (Dex). After 4 and 24 hours of the last ocular challenge, mice samples (blood, lacrimal fluid, eyes, cervical lymph nodes) were processed for analysis.

**Results:** rGal-1 administration on days 14-16 was effective to reduce clinical signs of AC in mice, also demonstrated for Dex, and plasma anti-OVA IgE levels compared to the untreated AC group. After 4 hours of the last OVA challenge, AC increased significantly the mast cell and transmigrated neutrophil numbers in the conjunctiva and, after 24 hours, neutrophilia and eosinophilia were observed. These findings were associated with a significant reduction of Gal-1 expression in the lamina propria of conjunctiva, after 4 hours, followed by an increase in the epithelium, after 24 hours. Anti-inflammatory effect of Dex treatment by inhibiting eosinophilia was positively correlated with higher levels of endogenous Gal-1 in conjunctiva, after 24 hours. In contrast, rGal-1 administration reduced its endogenous levels in the conjunctiva producing eosinophilia and IL-4 increased levels in the eyes. Systemically, rGal-1 and Dex produced anti-allergic effects as detected by significant decrease of Th2 (IL-4 and IL-13) and eotaxin levels in the lymph nodes, and Th1 (IFN- $\gamma$ ) in the lacrimal fluid.

**Conclusion:** Gal-1 exhibited protective effects during ongoing AC model indicate it as an important target for novel therapeutic strategies in ocular allergic inflammations.

Keywords: galectin, eosinophils, mast cells, ocular allergy, Th1/Th2 cytokines, immunohistochemistry.

### **Introduction**

Allergic conjunctivitis (AC) is an inflammation of the conjunctiva triggering by IgE-mediated (type I hypersensitivity reaction) and/or non-IgE mediated (type IV - delayed hypersensitivity) immune response to allergens [1]. Besides conjunctiva, AC affects ocular surface, including lids, cornea, and tear film, and their symptoms and clinical signs vary since eye redness, chemosis and itching until irreversible injury in the cornea, affecting the visual function [1, 2]. The pharmacological treatment of AC includes antihistamines, mast cell membrane stabilizers, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids which are used in the more severe forms and have a greater risk of adverse effects such as increased intraocular pressure and cataractogenesis [1, 3]. Thus, the discovery of new pharmacological agents that have high efficacy in controlling the inflammatory response with fewer side effects is critical.

In this scenario, we highlight the galectin-1 (Gal-1), a 14.5 kDa  $\beta$ -galactoside binding mammalian lectin, with anti-inflammatory properties exhibited in models of chronic inflammation and autoimmunity. In experimental autoimmune diseases, Gal-1 has altered cytokine secretion by reducing levels of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), IL-2 and IL-12 and increasing IL-5 and IL-10 [4-6] and, thus, regulating lymphocyte roles. Homing of wild-type (WT) T lymphocytes is significantly increased to mesenteric lymph nodes and to the inflamed paw in a model of delayed-

type hypersensitivity compared to Gal-1 null mice [7]. Additionally, recombinant Gal-1 (rGal-1) administration inhibited the human neutrophil [8] and lymphocyte [7] migration through endothelial cells upon in vitro inflammatory stimulus with IL-8 or TNF- $\alpha$ , respectively. Mast cell degranulation can also be negatively regulated by rGal-1 administration during phospholipase A2-induced oedema in rat paw [9], as well as neutrophil extravasation into the peritoneal cavity after 4 hours of carrageenan- [10], zymosan- [11] or IL-1 $\beta$ -induced peritonitis [8] in rodents. This Gal-1 anti-migratory effect has been associated with the expression of adhesion molecules (L-selectin and  $\beta$ 2-integrin) on the leukocyte membrane [7, 11, 12], but not on the endothelium (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1) [7]. Besides these immunomodulatory roles, the mechanisms by which Gal-1 modulates cell responses in allergic inflammatory processes are still unclear, especially in ocular models.

Supported by the notion that the increased risk of adverse effects provided by current therapies to treat AC [13, 14] and that the anti-inflammatory activities of Gal-1 have been poorly explored in ocular inflammatory processes, we evaluated here the mechanism of action of this protein in an experimental model of ovalbumin (OVA)-induced AC in mice.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Male BALB/c mice, weighing 20-25g, were randomly distributed into 7 groups (n = 5 animals/group). The animals were housed in a 12 h light-dark cycle and were allowed food and water ad libitum. All experimental procedures were submitted to and approved

by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of São Paulo - UNIFESP (CEP nº 1984/11).

### **Allergic conjunctivitis model and treatment protocols**

Mice BALB/c were immunized on days 0 and 7 with a subcutaneous injection of 5 µg of ovalbumin (OVA, grade V) and 15 mg/mL of aluminium hydroxide adjuvant diluted in 200 µL of sterile saline according to models reported [15, 16] with modifications. On days 14, 15 and 16 after an intraperitoneal (i.p.) injection of anaesthesia with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg), mice received the direct instillation of 250 µg of OVA in 10 µL of sterile saline onto the conjunctival sac. Control animals received sterile saline alone.

To determine the therapeutic efficacy of the exogenous administration of Gal-1 in this model, sensitized mice were pretreated i.p. on days 14, 15 and 16 with 0.3 µg/animal of recombinant Gal-1 protein (rGal-1; Peprotech, EC Ltd, London, UK) [8, 11] or dexamethasone (Dex) (1 mg/kg, Sigma-Aldrich) [17], diluted in 0.1 mL of sterile saline, 15 minutes before the instillation of OVA.

Four and 24 hours after the last OVA challenge, mice were anaesthetized to obtain blood through cardiac puncture using a syringe with 10% EDTA 10% for analysis of anti-OVA IgE levels and leukocyte quantification. The lacrimal fluid was collected by direct instillation of 20 µL of sterile saline into the conjunctival sac of each eye, providing a pool of 40 µL/animal. The animals were then sacrificed and the eyes and cervical lymph nodes were collected.

**Clinical score**

After 20 minutes of OVA challenge, mice were examined on days 14, 15 and 16 in order to clinically verify the occurrence and severity of conjunctivitis. Four clinical signs were observed: chemosis, conjunctival hyperaemia, lid oedema and tearing. Scoring similar to that described by MAGONE et al. (1998) [18] was performed, and each parameter was graded on a scale ranging from 0 to 3+ (0 = absence; 1 = mild; 2 = moderate and 3 = severe symptoms). Thus, each animal received a total clinical score of ranging from 0 to 12+, and the data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for each group.

**Blood leukocyte quantification**

Aliquots of blood (10  $\mu$ L) were diluted 1/20 in Turk's solution (0.1% crystal violet diluted in 3% acetic acid) and differential counting was obtained with a Neubauer chamber using a 40X objective on an light microscope. For this study blood cells were distinguished as neutrophils, eosinophils and monocytes. Data were reported as mean  $\pm$  SEM of the number of cells  $\times 10^5$ /mL.

**Analysis of IgE anti-ovalbumin levels**

Whole blood was centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes to collect the plasma and determine the IgE anti-OVA levels by ELISA at different experimental conditions. The concentration of IgE anti-OVA was measured using a commercially available mouse IgE anti-OVA immunoassay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) with levels estimated according to the manufacturer's instructions. All estimations were made in duplicate and the data expressed the mean  $\pm$  SEM.



**Histopathology and quantification of inflammatory cells in ocular tissues**

The right eyes were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, washed in tap water, dehydrated in a decreasing ethanol series, and embedded in paraffin. Sections of 4 µm were obtained in a Leica RM2155 microtome and subsequently stained with haematoxylin-eosin or toluidine blue 0.5% (Taab Laboratories, UK) for histopathological analysis.

Inflammatory cells were quantified using a high power objective (63X) on an Axioskop 2-Mot Plus Zeiss microscope (Carls Zeiss, Jena, Germany). Three semi-serial sections of conjunctiva were analysed per animal and the area was determined using AxioVision software (Carl Zeiss). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the number of cells per 0.1 mm<sup>2</sup>.

**Immunohistochemistry**

The detection of endogenous Gal-1 in bulbar conjunctiva was conducted in 4 µm sections of paraffin-embedded eyes. After an antigen retrieval step using citrate buffer pH 6.0, the endogenous peroxidase activity was blocked and the sections were incubated overnight at 4°C with the primary rabbit polyclonal antibody anti-Gal-1 (1:200) (Zymed Laboratories, Cambridge, U.K.), diluted in 1% BSA. After washing, sections were incubated with a secondary biotinylated antibody (LAB-SA Detection kit, Invitrogen, Paisley, U.K.). Positive staining was detected using a peroxidase-conjugated streptavidin complex and colour was developed using DAB substrate (Invitrogen). The sections were counterstained with haematoxylin.

Densitometric analyses for the Gal-1 immunostaining were performed in the epithelium and lamina propria of bulbar conjunctiva (n = 5 animals/group). The values were obtained as arbitrary units (a.u.) between 0 and 255 using AxioVision software on an Axioskop 2-Mot Plus Zeiss microscope (Carls Zeiss). The data were expressed as the mean  $\pm$  SEM of arbitrary units.

### **Analysis of Th1/Th2 cytokines and chemokines**

To assess cytokine and chemokine levels, left eyes and cervical lymph nodes were macerated in liquid nitrogen, lysed on ice for 15 minutes in a solution containing complete mini-EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 1% Triton-X, pH 7.4. The samples were centrifuged at 12,000 rpm for 20 minutes at 4°C to obtain organ supernatants. For multiplex analysis, 25  $\mu$ l of the organ supernatants and lacrimal fluids were employed using the MILLIPLEX MAP mouse cytokine/chemokine panel (MCYTMAG-70K-PX32; Millipore Corporation, USA) and MAGPIX® Multiplexing Instrument (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Nine analytes were studied: IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), eotaxin, Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). The concentration of analytes was determined by MAGPIX Xponent software (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and the results reported as the mean  $\pm$  SEM.

### **Statistical Analysis**

The data were analysed using GraphPad software version 4.00. Significant differences between two groups were determined using Student's t test; more than two conditions

were analysed by the Bonferroni test. In all cases, a probability value  $< 0.05$  was considered significant.

## Results

### **Clinical signs of the allergic conjunctivitis and IgE anti-OVA levels are reduced by rGal-1 administration**

Initially, we evaluated the clinical response of the animals in the AC model, on days 14-16, 20 minutes after OVA instillation in the eyes. Mice from AC group exhibited moderate to severe signs of chemosis, conjunctival hyperaemia, lid oedema and tearing (Figures 1D-F) in relation to controls (Figures 1A-C). Pharmacological treatments with Dex and rGal-1 produced anti-inflammatory effects decreasing these signs (Figures 1G-L) compared to untreated AC group. Score data confirmed our observations with a significant increase in the inflammatory response caused by OVA challenge in AC on days 14 and 16 (Figures 1M and O). The rGal-1 treated-group decreased significantly the score during three challenge days compared to the untreated AC group (Figures 1M-O), whereas Dex reduced only on day 14.

The IgE anti-OVA levels were significantly increased in the plasma of mice after 4 and 24 hours of the last OVA challenge (AC group) compared to controls (Figure 2), supporting the efficacy of our experimental model. Pharmacological treatments significantly decreased the levels of this antibody after 4 hours.

### **Effects of rGal-1 in the allergic inflammatory response of the conjunctiva**

We first evaluated the leukocyte recruitment from blood due to allergic response (Table 1). After 4 hours, AC mice exhibited blood neutrophilia and, after 24 hours, no alterations in the leukocyte numbers were detected compared to the control animals. The rGal-1 treatment induced a significant increase of monocytes in the initial phase of allergy (4 hours) and a reduction in the eosinophil numbers in the two time-points compared to the untreated AC group. No significant effects were detected in the leukocyte counts for Dex treatment.

Histopathological and quantitative analysis displayed normal appearance of control conjunctivas with fibroblasts and intact metachromatic mast cells in the connective tissue (Figures 3A and E). In contrast, sensitized and challenged-OVA mice exhibited intense inflammatory response characterized by increased mast cell numbers (Figure 3B and K) and neutrophil influx (Figure 3I), after 4 hours, and neutrophilia and eosinophilia at 24 hours (Figures 3F, I and J). The rGal-1 and Dex produced similar effects in the mast cell population with diminished cell numbers in the conjunctiva (Figures 3C-D) compared to untreated AC group, but not significantly altered (Figure 3K). Dex-treated group also showed reduced leukocyte influx, especially eosinophils at 24 hours (Figure 3G and J), whereas rGal-1 treatment was associated with eosinophilia into the conjunctiva at 4 hours (Figure 3J) and also observed at 24 hours (Figure 3G).

### **Gal-1 expression is modulated in the conjunctiva during allergic inflammatory response**

The immunohistochemistry revealed the presence of endogenous Gal-1 in the conjunctiva of control animals localized in the surface epithelial cells and lamina

propria (Figure 4A). After 4 hours of OVA challenge, lower Gal-1 immunoreactivity was observed in the lamina propria (Figure 4B), whereas high levels were detected in the epithelium after 24 hours (Figure 4F). The pharmacological treatments produced intense Gal-1 immunostaining in both compartments (epithelium and lamina propria) in the initial phase of allergic response (Figures 4C and D) compared to untreated AC group. After 24 hours, opposite effects were detected for both treatments, Dex increased protein levels in the epithelium and lamina propria (Figure 4G) whereas rGal-1 decreased its endogenous expression (Figure 4H). No immunostaining was detected in the negative control section (Figure 4E). The histological findings were supported by densitometry analyses of Gal-1 expression in the epithelial cells and lamina propria of conjunctiva (Figures 4I and J, respectively).

#### **rGal-1 regulates Th1/Th2 and eotaxin levels during ocular allergy**

The initial phase of AC, 4 hours, was characterized by marked increase of TNF- $\alpha$  (Th1) in the lacrimal fluid (Figure 5F) and IL-4 (Th2) in the lymph nodes (Figure 5H). After 24 hours, IL-4 retained its high dosage in the lymph nodes and lacrimal fluid (Figures 5H and K, respectively), and the latter also presented elevated levels of IFN- $\gamma$  (Figure 5E).

Similar anti-inflammatory effects of Dex and rGal-1 treatments were exhibited for Th1 reduction, as detected at 4 hours in the TNF- $\alpha$  levels in the lymph nodes (Figure 5C) compared to control, and IFN- $\gamma$  in the lacrimal fluid (Figure 5E) compared to untreated AC group at 24 hours. For Th2 profile, both treatments were effective to reduce IL-4 and IL-13 in the lymph nodes at 4 hours of AC (Figures 5H and J, respectively).

Different regulation of Th1/Th2 profile was also observed by both pharmacological treatments. In the initial phase of AC, Dex reduced significantly IL-2 levels in the lacrimal fluid in relation to AC group (Figure 5D). At 24 hours, opposite effects were detected for this cytokine production demonstrated by diminished (eyes) and elevated (lymph nodes) levels induced by rGal-1 (Figure 5G) and Dex (Figure 5A), respectively. In addition, in this late phase, Dex reduced TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-13 levels in the lacrimal fluid (Figures 5F, K and M, respectively), whereas rGal-1 increased IL-4 in the eyes (Figure 5N) compared to untreated AC group.

No alterations were detected in the IL-5 levels of all samples analyzed (Figures 5 I, L and O) and IFN- $\gamma$  in the lymph nodes (Figure 5B).

Chemokine evaluation in the eyes exhibited increased levels of MCP-1 in the AC groups (treated or not with Dex and rGal-1) compared to control (Figure 6D), whereas no significant alterations were detected for eotaxin and RANTES (data not shown). In contrast, high eotaxin levels in the lymph nodes characterized AC model at 24 hours (Figure 6A) that was efficiently reduced by rGal-1 and Dex treatments. In addition, Dex treated-groups presented reduced production of RANTES (Figure 6B) and MCP-1 (Figure 6C) in these organs compared to AC and control groups. No differences were presented in the chemokine production of the lacrimal fluid among experimental groups (data not shown).

## **Discussion**

We evaluated here the therapeutic potential and mechanism of action of Gal-1 on ocular inflammation using a classical AC model induced by OVA in mice [15, 16]. Initially,

we confirmed the efficacy of our AC model through the detection of clinical signs of conjunctivitis, such as intense conjunctival hyperaemia, chemosis, lid oedema and tearing, as well as by the increased plasma levels of IgE anti-OVA, corroborating previous studies [15, 19]. In addition, the initial phase of the allergic response in the conjunctiva, 4 hours after the last OVA challenge, was characterized by a significant increase in neutrophil and mast cell subpopulations and, in the late phase, 24 hours, by neutrophilia and eosinophilia. Our histological findings are consistent with the previous reports using AC experimental models induced by different antigens, such as OVA [15, 16], ragweed pollen [20-22], mite [23] and cat dander extract [24].

The importance of mast cells in the induction of neutrophil and eosinophil transmigration has been demonstrated in models of acute [25], systemic [26] and allergic [24, 27] inflammations. Two of these studies, using the method of selective depletion of mast cells by 48/80 compound showed decreased neutrophil influx in the peritoneal cavity, after 4 hours of zymosan-induced peritonitis [25], and in aqueous humor, after 24 hours of lipopolysaccharide-induced uveitis [26] compared to animals with non-depleted mast cells. In ragweed pollen-induced AC, mice deficient for mast cells exhibited no clinical signs and eosinophilia in the conjunctiva as intense as in wild-type animals after pollen challenge in the conjunctival sac [24, 27]. This effect was reverted when the deficient mice were repopulated with mast cells, showing them as essential for the early response induction of AC (clinical signs) and eosinophil recruitment.

Dex-treated group exhibited a decrease in the clinical signs of AC, as well as in the inflammatory cell recruitment into the conjunctiva, especially in the late phase of the

allergic response. These findings supporting studies using AC models in mice [15] and guinea pigs [20] induced by OVA and ragweed pollen, respectively. Once characterized the anti-inflammatory effects of Dex in AC model, we focus our studies to understand the therapeutic potential of rGal-1. This lectin administration exhibited effective anti-inflammatory action with a significant decrease in clinical signs of conjunctivitis observed in all challenge days (14, 15 and 16). rGal-1-treated group also showed diminished mast cell numbers in the conjunctiva compared to untreated animals (AC group), besides not significant, especially in the later phase (24 hours), which is interesting once these cells is involved in triggers clinical symptoms of ocular allergy [24, 27]. Similar findings were detected in a phospholipase A2-induced oedema model in rat paw which pharmacological pretreatment with Gal-1 reduced clinical signs and mast cell number in the tissue at 4 hours. Additionally, studies in our laboratory have shown that mast cells express Gal-1 in their cytoplasmic granules and its endogenous levels are modulated by the glucocorticoids in humans [28], in gastric carcinogenesis and myenteric denervation in rats [29], but not altered in the acute inflammatory response induced by carrageenan in these animals [10]. Thus, mast cells are important sources of Gal- 1 to the connective tissue, and in the experimental AC model, the exogenous action of Gal- 1 is essential to reduce the mast cell activation and regulate the triggering of clinical signs of this disease.

Furthermore, rGal-1 showed a chemotactic effect on blood monocytes, after 4 hours of last OVA challenge, as detected in a classic zymosan-induced peritonitis model which peritoneal mononuclear-phagocytic cell population was increased in rGal-1-treated mice compared to the untreated group [11]. In vitro assays showed that this chemotactic role



of Gal-1 on monocytes occurred by its CRD binding, once the addition of lactose reduced this effect at 65%, and by alteration of the MAP kinase pathways [30].

The rGal-1 pretreatment also caused in the initial phase, a significant reduction in blood eosinophil numbers which probably was due by its high migration to the conjunctiva at this time-point. Eosinophils are key cells in allergic inflammatory response and express Gal-1 protein whose endogenous levels are not modulated by the glucocorticoid betamethasone as demonstrated in studies of human nasal polyposis [28]. In vitro assays showed notable decreased migration and increased adhesion of the human eosinophil onto Gal-1-coated support compared to P-selectin-coated [31]. Additionally, in a concentration and time-dependent manner Gal-1-coated supports markedly activated eosinophils as revealed by an increase in the level of ECP (eosinophil cationic protein) expression. Therefore, exogenous role of Gal-1 in allergic inflammation involves eosinophil migration and activation processes which may be counterbalanced by mast cell regulation.

Prompt by the data about Gal-1 expression in nasal polyps, we investigated this lectin levels in the conjunctiva at different experimental conditions. As expected, Gal-1 immunoreactivity was positive in the surface epithelial cells and lamina propria of the conjunctiva, supporting previous data of this lectin localization in the anterior segment of the human eye [32]. After 4 hours of last OVA challenge, endogenous Gal-1 levels decreased in the lamina propria of the conjunctiva, followed by an increase in the epithelium in the late phase of the response. The modulation of Gal-1 levels was also observed in the carrageenan-induced peritonitis model in rats in which neutrophils showed low levels of endogenous Gal-1 in the early phase of inflammation (4 hours),

and high after 24 hours [33]. Thus, decreased levels of Gal-1 in the lamina propria of conjunctiva during AC facilitate leukocyte transmigration, whereas epithelium consists as a potential source of this lectin for tissue.

The addition of rGal-1 by pharmacological treatment inhibits its endogenous expression in the epithelium and conjunctiva at 24 hours of last OVA challenge, besides its increase in the initial phase (4 hours), probably as a mechanism of negative feedback. In contrast, Dex-treated groups increased significantly Gal-1 in the two compartments analyzed of the conjunctiva, especially after 24 hours. Previous investigations in nasal polyps, including those from our laboratory, also indicate upregulation of Gal-1 mRNA and protein after glucocorticoid treatments (budesonide and betamethasone), particularly in epithelial and connective tissues [28, 31, 34]. Therefore, in the ocular inflammatory response induced by AC, anti- or pro-migratory effects on leukocytes are positively associated with high and low levels of Gal-1 in the lamina propria, respectively, suggesting an important role for this lectin for leukocyte-matrix adhesion in the ocular allergy.

Several studies indicate that the counterbalance of the responses generated by the Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2 and IL-12) and Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13) cytokine production are important in the allergic inflammatory regulation. Studies suggest a cross-regulation of IL-4 and IFN- $\gamma$ , able to inhibit both Th1 and Th2 responses, respectively, providing evidence for the complexity of the Th1/Th2 interactions [35, 36].

In this aspect, our study exhibited in the early phase of the allergic response, 4 hours, elevated levels of TNF- $\alpha$  (lacrimal fluid) and IL-4 (lymph nodes), and after 24 hours, IFN- $\gamma$  (lacrimal fluid) and IL-4 (lacrimal fluid and lymph nodes), confirming Th1/Th2 balance demonstrated in studies using AC models [16, 23, 37-40].

The rGal-1 and Dex pharmacological treatments also showed changes in both cytokine profiles with significant reduction of IL-4 and IL-13 (Th2) in lymph nodes at 4 hours. In the late phase (24 hours), they produced opposite effects in the IL-4, with a decrease in the lacrimal fluid by Dex and increase in the eyes by rGal-1 which corroborates the high number of eosinophils observed in the conjunctiva of lectin-treated group. Both treatments also altered Th1 pattern decreasing IL-2 (eyes and lacrimal fluid) and IFN- $\gamma$  (lacrimal fluid). In addition, Dex-treated group produced increased IL-2 levels in the lymph nodes and reduced TNF- $\alpha$  in the lacrimal fluid, after 24 hours. Regulatory effects of Dex in the Th2 cytokine (IL-4 and IL-5) expression have been reported in bronchoalveolar lavage and lung of animals treated with this drug in a model of OVA-induced asthma [41, 42]. Indeed, potent anti-inflammatory role for Gal-1 have been shown in the Th1 cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-12) through experimental models of acute [11] and systemic [4-6] inflammations. In ocular inflammations this protective effect of Gal-1 was demonstrated in experimental models of Th1 responses, such as uveitis [5] and herpetic stromal keratitis [43]. In this scenario, our study is the first to demonstrate a negative regulation of Th2 cytokines by Gal-1 in in vivo ocular allergy model. Additionally, the intricate role of Th1/Th2 cytokine regulation by pharmacological treatments in our study indicates different pathways for Dex and Gal-1 to develop their immunomodulatory functions.

Finally, our AC model was characterized by increased levels of eotaxin in the lymph nodes after 24 hours which was efficiently reduced by pharmacological treatments in the same experimental time. Dex-treated group also decreased MCP-1 and RANTES in these organs. The role of these chemokines and their expression increase in the ocular allergic responses has been exhibited in other studies [44-46]. Deficient mice for eotaxin presented reduced immediate hypersensitivity reactions in cat dander extract-induced AC model [45]. In addition, subconjunctival injection of recombinant MCP-1 stimulates mast cell degranulation and monocyte/macrophage recruitment, as well as MCP-1 or its receptor CCR2 blockades by specific antibody or antagonist treatments, respectively, suppressed significantly clinical signs of conjunctivitis in the animals, supporting the role of MCP-1 in the mast cell degranulation [46]. Altogether, data demonstrate an important inhibitory role of systemic humoral response for Gal-1, suggesting this lectin as promising target to study delayed hypersensitivity allergic diseases (type IV).

In conclusion, our results indicate protective role for Gal-1 during ongoing ocular allergy. Its anti-inflammatory effect was evidenced by marked reduction of clinical signs of AC and Th2 (IL-4 and IL-13) and eotaxin levels in lymph nodes. In contrast, at late phase, when its endogenous levels decreased significantly in the conjunctiva, possibly induced by a negative feed-back mechanism of its exogenous administration, the proinflammatory scenario is recognized by eosinophilia and increased IL-4 levels in the eyes. In addition, to counterbalance high Th2 production, decreased Th1 (TNF- $\alpha$  and IL-2) were detected in the eyes and lacrimal fluid. Therefore, Gal-1 is a potential target for the development of new therapeutic strategies in ocular inflammation.

## ACKNOWLEDGMENTS

CB MELLO-BOCHI and L RAMOS were supported by CAPES and FAPESP (2012/10574-1) scholarships. This study was supported by FAPESP (2011/21845-3) and CNPq (476136/2011-3).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Friedlaender MH, Ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11: 477-82.
2. Rosario N, Bielory L, Epidemiology of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11: 471-6.
3. Pacharn P, Vichyanond P, Immunomodulators for conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13: 550-7.
4. 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.
5. 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.
6. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Rabinovich GA, Morelli A, Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2003;124: 1381-94.

7. Norling LV, Sampaio AL, Cooper D, Perretti M, Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J* 2008;22: 682-90.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Read RW, Yu F, Accorinti M, Bodaghi B, Chee SP, Fardeau C, Goto H, Holland GN, Kawashima H, Kojima E, Lehoang P, Lemaitre C, Okada AA, Pivetti-Pezzi P, Secchi A, See RF, Tabbara KF, Usui M, Rao NA, Evaluation of the effect on outcomes of the route of administration of corticosteroids in acute Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Am J Ophthalmol* 2006;142: 119-24.
14. Rosenbaum JT, Future for biological therapy for uveitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;21: 473-7.

15. Shoji J, Sakimoto T, Muromoto K, Inada N, Sawa M, Ra C, Comparison of topical dexamethasone and topical FK506 treatment for the experimental allergic conjunctivitis model in BALB/c mice. *Jpn J Ophthalmol* 2005;49: 205-10.
16. Chung SH, Nam KH, Kweon MN, Staphylococcus aureus accelerates an experimental allergic conjunctivitis by Toll-like receptor 2-dependent manner. *Clin Immunol* 2009;131: 170-7.
17. Damazo AS, Yona S, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM, Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J Immunol* 2006;176: 4410-8.
18. Magone MT, Chan CC, Rizzo LV, Kozhich AT, Whitcup SM, A novel murine model of allergic conjunctivitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87: 75-84.
19. Chung YW, Oh HY, Kim JY, Kim JH, Kim IY, Allergen-induced proteolytic cleavage of annexin-1 and activation of cytosolic phospholipase A2 in the lungs of a mouse model of asthma. *Proteomics* 2004;4: 3328-34.
20. Sohn J, Kim TI, Yoon YH, Kim JY, Kim SY, Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. *J Clin Invest* 2003;111: 121-8.
21. Fukushima A, Ishida W, Ojima A, Kajisako M, Sumi T, Yamada J, Tsuru E, Miyazaki J, Tominaga A, Yagita H, Participation of CD11b and F4/80 molecules in the conjunctival eosinophilia of experimental allergic conjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151: 129-36.
22. Ono SJ, Lane K, Comparison of effects of alcaftadine and olopatadine on conjunctival epithelium and eosinophil recruitment in a murine model of allergic conjunctivitis. *Drug Des Devel Ther* 2011;5: 77-84.

23. Giavina-Bianchi P, Kalil J, Rizzo LV, Development of an animal model for allergic conjunctivitis: influence of genetic factors and allergen concentration on immune response. *Acta Ophthalmol* 2008;86: 670-5.
24. Miyazaki D, Tominaga T, Yakura K, Kuo CH, Komatsu N, Inoue Y, Ono SJ, Conjunctival mast cell as a mediator of eosinophilic response in ocular allergy. *Mol Vis* 2008;14: 1525-32.
25. Ajuebor MN, Das AM, Virág L, Flower RJ, Szabó C, Perretti M, Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol* 1999;162: 1685-91.
26. da Silva PS, Girol AP, Oliani SM, Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis* 2011;17: 1310-9.
27. Fukuda K, Ohbayashi M, Morohoshi K, Zhang L, Liu FT, Ono SJ, Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124: 827-33.e2.
28. 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.
29. Estofolete CF, Zucoloto S, Oliani SM, Polli-Lopes AC, Gil CD, Myenteric denervation downregulates galectin-1 and -3 expression in gastric carcinogenesis. *Dig Dis Sci* 2011;56: 1637-44.
30. 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.



31. 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.
32. 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.
33. Gil C, Cooper D, Rosignoli G, Perretti M, Oliani S, Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and-3 expression in a model of rat peritonitis. *Inflammation Research* 2006;55: 99-107.
34. 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.
35. Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DH, Lawson BR, The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 2001;3: 136-41.
36. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS, TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol* 2003;4: 503-5.
37. Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, Calder VL, Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 777-84.
38. Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Tsuru E, Ueno H, Analysis of the interaction between IFN-gamma and IFN-gammaR in the effector phase of experimental murine allergic conjunctivitis. *Immunol Lett* 2006;107: 119-24.

39. Li DQ, Zhang L, Pflugfelder SC, De Paiva CS, Zhang X, Zhao G, Zheng X, Su Z, Qu Y, Short ragweed pollen triggers allergic inflammation through Toll-like receptor 4-dependent thymic stromal lymphopoietin/OX40 ligand/OX40 signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128: 1318-25.e2.
40. Fukuda K, Kuo CH, Morohoshi K, Liu FT, Ono SJ, The murine CCR3 receptor regulates both eosinophilia and hyperresponsiveness in IgE-mediated allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2012;96: 1132-6.
41. Ma C, Ma Z, Liao XL, Liu J, Fu Q, Ma S, Immunoregulatory effects of glycyrrhizic acid exerts anti-asthmatic effects via modulation of Th1/Th2 cytokines and enhancement of CD4(+)CD25(+)Foxp3+ regulatory T cells in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol* 2013;148: 755-62.
42. Seo JW, Cho SC, Park SJ, Lee EJ, Lee JH, Han SS, Pyo BS, Park DH, Kim BH, 1'-Acetoxychavicol acetate isolated from *Alpinia galanga* ameliorates ovalbumin-induced asthma in mice. *PLoS One* 2013;8: e56447.
43. Rajasagi NK, Suryawanshi A, Sehrawat S, Reddy PB, Mulik S, Hirashima M, Rouse BT, Galectin-1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunopathological lesions. *J Immunol* 2012;188: 4631-43.
44. Ozaki A, Fukushima A, Fukata K, Ueno H, Mast-cell activation augments the late phase reaction in experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241: 394-402.
45. Miyazaki D, Nakamura T, Ohbayashi M, Kuo CH, Komatsu N, Yakura K, Tominaga T, Inoue Y, Higashi H, Murata M, Takeda S, Fukushima A, Liu FT, Rothenberg ME, Ono SJ, Ablation of type I hypersensitivity in experimental allergic conjunctivitis by eotaxin-1/CCR3 blockade. *Int Immunol* 2009;21: 187-201.

46. Tominaga T, Miyazaki D, Sasaki S, Mihara S, Komatsu N, Yakura K, Inoue Y, Blocking mast cell-mediated type I hypersensitivity in experimental allergic conjunctivitis by monocyte chemoattractant protein-1/CCR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50: 5181-8.

**Table 1.** Quantification of leukocytes in the blood.

Groups		Cells x 10 <sup>5</sup> per mL		
		Eosinophils	Neutrophils	Monocytes
4 hours	Control	0.40 ± 0.2	4.41 ± 2.0	2.3 ± 0.9
	AC	0.83 ± 0.1	15.63 ± 2.8*	4.08 ± 0.6
	AC+Dex	0.60 ± 0.1	15.00 ± 2.0	3.75 ± 0.7
	AC+rGal-1	0.08 ± 0.0 <sup>##</sup>	13.13 ± 2.3	19.10 ± 2.7***
24 hours	AC	0.32 ± 0.1	9.15 ± 0.71	2.92 ± 0.4
	AC+Dex	0.62 ± 0.1	10.65 ± 5.6	2.31 ± 0.2
	AC+rGal-1	0.04 ± 0.0 <sup>#</sup>	9.20 ± 0.6	4.10 ± 0.50

Data represent the mean ± SEM of the number of leukocytes x 10<sup>5</sup>/mL in mice at different experimental conditions (n = 5 animals/group). \*P < 0.05 vs. control; \*\*\*P < 0.001 vs. control, AC, AC+Dex (4 hours); <sup>#</sup>P < 0.05 and <sup>##</sup>P < 0.01 vs. AC at the same experimental time.

## Figure Legends

**Figure 1. Clinical score of allergic conjunctivitis.** Mice were challenged with OVA (AC) or sterile saline (control)[A-C] and clinical appearance evaluated after 20 minutes on days 14-16. AC group presented chemosis, lid edema, conjunctival hyperemia and tearing [D-F], which were reduced after Dex [G-I] and rGal-1 [J-L] treatments. [M-O] Data represents mean  $\pm$  S.E.M. of clinical score (n = 5-10 animals/group). \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 vs. Control; ##P < 0.01 and ###P < 0.001 vs. AC.

**Figure 2. Anti-ovalbumin IgE levels.** Data represents mean  $\pm$  SEM of immunoglobulin (ng/mL) in the mice plasma (n = 5/group). \*P < 0.05 and \*\*\*P < 0.001 vs. Control; #P < 0.05 vs. AC at correspondent experimental time.

**Figure 3. Histopathology of the bulbar conjunctiva.** Metachromatic intact mast cell (arrow) [A] and fibroblasts (arrowheads) [E] localized in the lamina propria (LP) of control conjunctiva after 4 and 24 hours. Epithelium (Ep). Increased mast cell numbers [B] and leukocyte influx [F] (arrows), especially eosinophil (inset), occurred after 4 and 24 hours, respectively. Dex-treated group [C, G] exhibited similar histology of the control group. Reduced mast cell population (arrow) [D] and eosinophilia (arrows; inset) [H] characterized Gal-1-treated group. Stain: hematoxylin-eosin. Bars: 10  $\mu$ m [A-G]; 20  $\mu$ m [H]; 5  $\mu$ m [insets of F and H]. [I-K] Quantitative analyses of inflammatory cells in the bulbar conjunctiva. Data represents the mean  $\pm$  SEM of the cell number analyzed per 0.1 mm<sup>2</sup> in the bulbar conjunctiva (n = 5/group). \*P < 0.05 and \*\*\*P < 0.001 vs. Control; #P < 0.05 and ###P < 0.01 vs. AC at correspondent experimental time.

**Figure 4. Expression of Gal-1 in the bulbar conjunctiva.** After 4 hours of last OVA challenge, low Gal-1 immunoreactivity was detected in the lamina propria (LP) of AC group [B] compared to control [A]. Dex increased Gal-1 levels in the epithelial cells (Ep), after 4 hours [C], and in both compartments after 24h [G] compared to untreated AC group [B, F]. rGal-1 increased its endogenous expression in the epithelium and lamina propria, after 4 hours [D], followed by decreased levels in both tissues after 24 hours [H]. Negative Control [E]. Counterstain: Hematoxylin. Bars: 10  $\mu$ m. Densitometric analysis of Gal-1 expression in the epithelial cells [I] and lamina propria [J]. Data (arbitrary units, a.u.) represents mean  $\pm$  S.E.M. of Gal-1 immunoreactivity. \*\*\*P < 0.001 vs. Control; #P < 0.01 and ###P < 0.001 vs. AC group at correspondent experimental time.

**Figure 5. Effect of rGal-1 in the Th1 and Th2 profiles in the lymph nodes, lacrimal fluid and eyes.** IL-2 (A, D, G), IFN- $\gamma$  (B, E), TNF- $\alpha$  (C, F), IL-4 (H, K, N), IL-5 (I, L, O) and IL-13 (J, M). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of cytokines (pg/mL) (n = 4-5/group). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 vs. Control; #P < 0.05, ##P < 0.01 and ###P < 0.001 vs. AC group at correspondent experimental time.

**Figure 6. Effect of rGal-1 in the chemokine levels in the lymph nodes and eyes.** Eotaxin (A), RANTES (B), MCP-1 (C, D). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of chemokine (pg/mL). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs. Control; #P < 0.05 and ##P < 0.01 vs. AC group (24h).

Figures

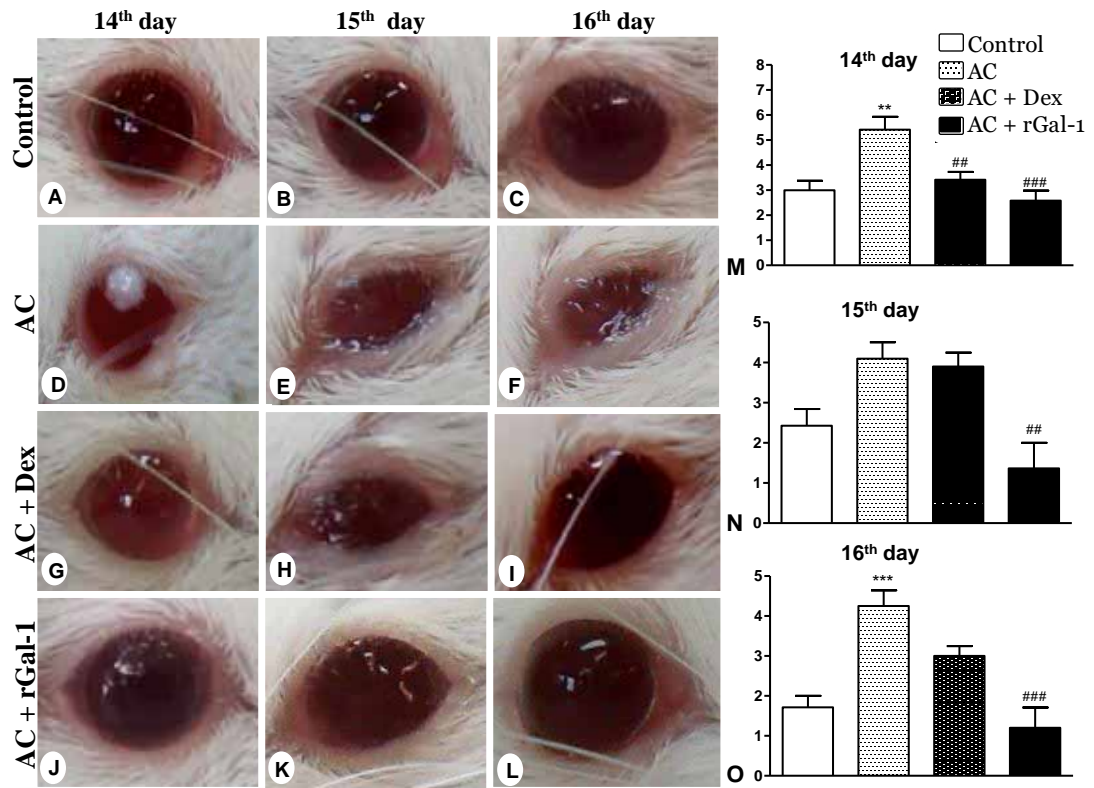


Figure 1

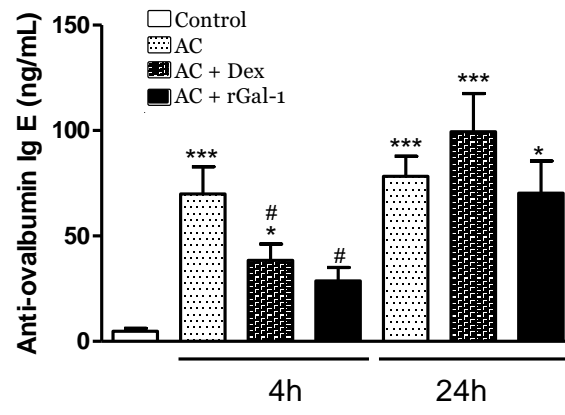


Figure 2



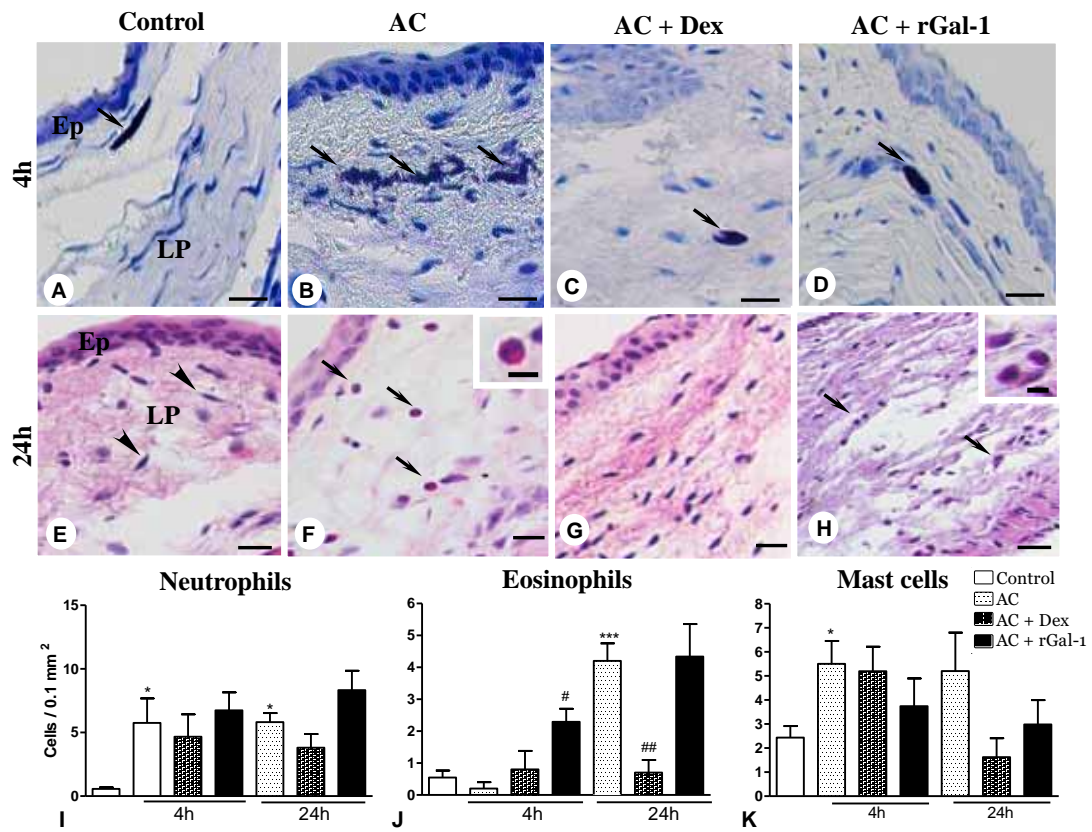


Figure 3

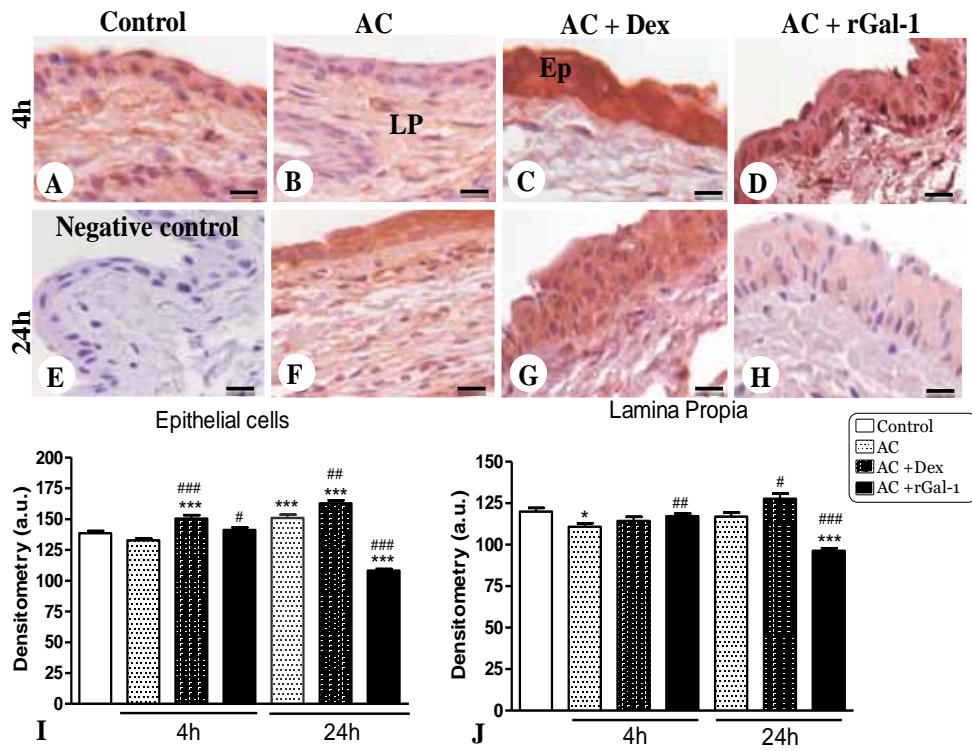


Figure 4

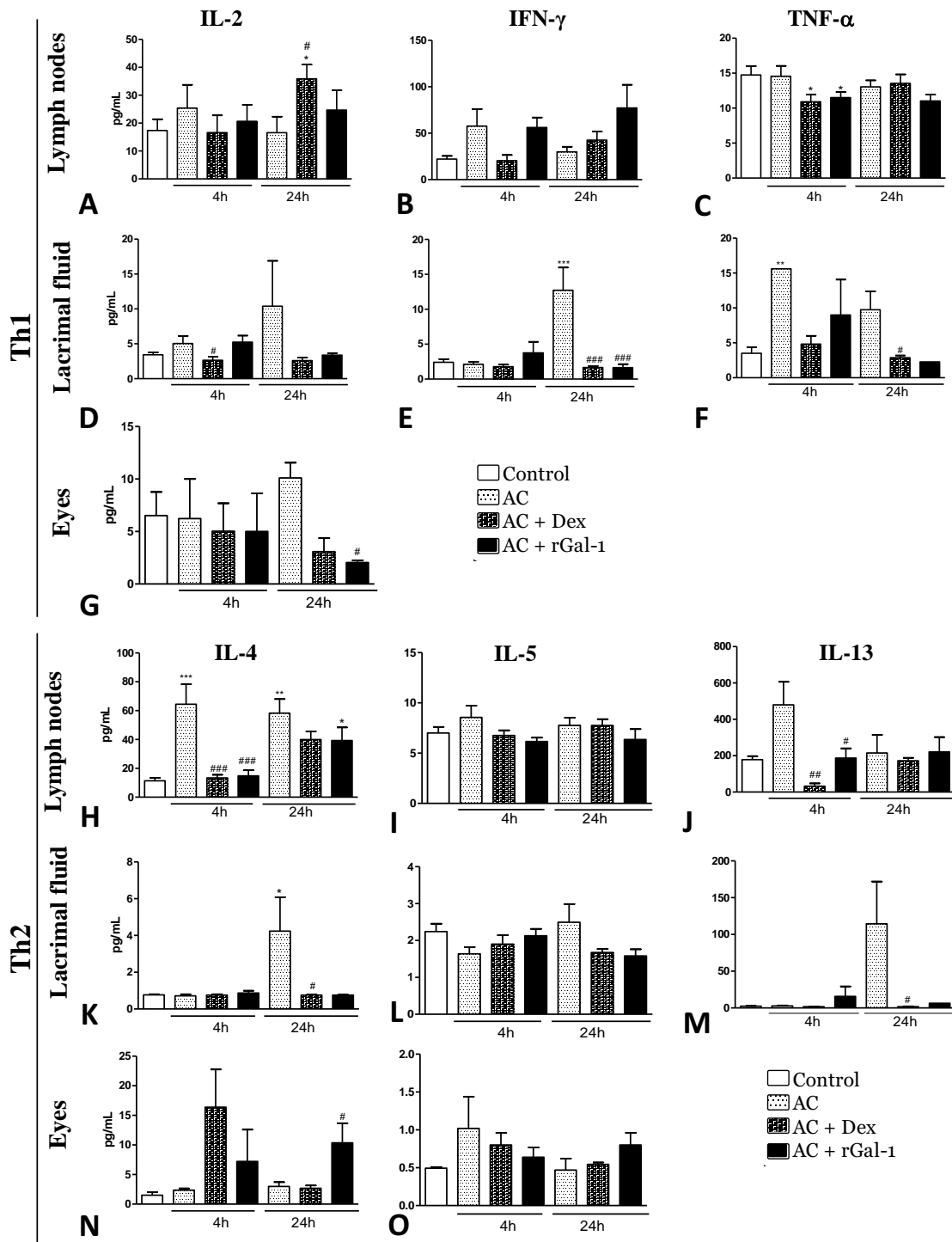


Figure 5

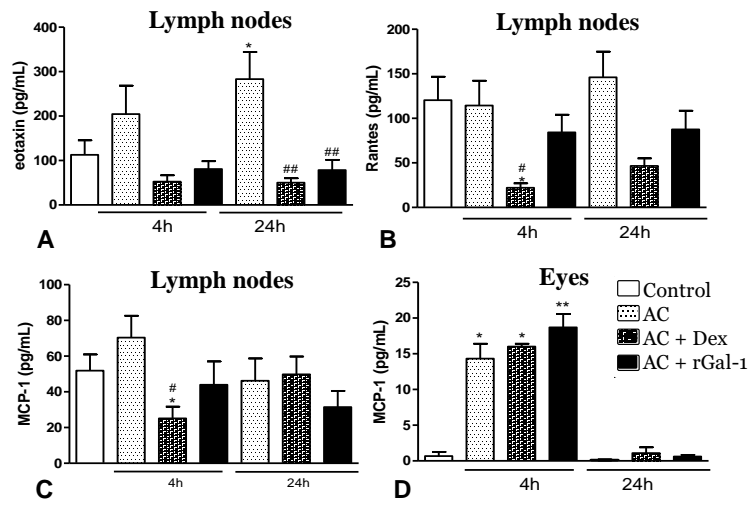


Figure 6

