



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



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Mab Pereira Corrêa

Estudo do papel da proteína Galectina-1 em modelo experimental de
Dermatite Atópica induzida por ovalbumina em camundongos

São José do Rio Preto
2017

Mab Pereira Corrêa

Estudo do papel da proteína Galectina-1 em modelo experimental de
Dermatite Atópica induzida por ovalbumina em camundongos

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Damas Gil

São José do Rio Preto
2017

Corrêa, Mab Pereira.

Estudo do papel da proteína Galectina-1 em modelo experimental de dermatite atópica induzida por ovalbumina em camundongos / Mab Pereira Corrêa. -- São José do Rio Preto, 2017
81 f. : il., tabs.

Orientador: Cristiane Damas Gil

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

1. Biologia molecular. 2. Proteínas - Estrutura. 3. Galectina 1.
4. Dermatite atópica. 5. Ovalbumina. 6. Mastócitos. 7. Eosinófilos.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.112

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

Mab Pereira Corrêa

Estudo do papel da proteína Galectina-1 em modelo experimental de
Dermatite Atópica induzida por ovalbumina em camundongos

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

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Cristiane Damas Gil
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rejane Maira Góes
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Jusciele Brogin Moreli
UNIFESP – São Paulo

São José do Rio Preto

3 de março de 2017

DEDICATÓRIA

À minha querida avó, Silvia Camilo Corrêa, por ser meu maior exemplo de vida, por me inspirar como pessoa e por sempre estimular a busca pelo conhecimento.

*À Profa. Dra. Cristiane Damas Gil, por quem tenho imensa
admiração, exemplo de mestre e pesquisadora. Meu
agradecimento pela oportunidade, orientação e
ensinamentos.*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2015/09858-3) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

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

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

Aos companheiros do Laboratório de Histologia da UNIFESP, Alexandre Dantas Gimenes, Frans Eberth Costa Andrade, Mariana Prado Marmorato, Tamires Barbosa Lucena da Rocha e à técnica Katia de Vasconcelos, equipe que muito estimo e exemplo de trabalho com alegria e entusiasmo.

À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, por ter aberto as portas de seu Laboratório para que essa pesquisa fosse realizada.

Aos colegas do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Claudia Bosnic Mello, Laila Toniol Cardin, Janesly Prates, Lucas Ribeiro de Azevedo, Lucas Possebon, Sara de Souza Costa, por todo o auxílio e por compartilharem seus conhecimentos.

À minha família que muito amo, obrigada pelos momentos maravilhosos, pelo apoio e crédito às minhas conquistas e por, acima de tudo, estarmos sempre unidos.

Ao Fabiano Brandini Molas, por estar ao meu lado, pela compreensão, e principalmente pelo carinho e fé na minha capacidade.

Enfim, a tantos outros amigos que de alguma maneira colaboraram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A dermatite atópica (DA) é provocada tanto pelo desequilíbrio das respostas imunes quanto pela quebra da barreira epitelial. Embora a galectina-1 (Gal-1), proteína ligante de β -galactosídeos, possua efeitos imunomoduladores em várias doenças inflamatórias, as estratégias terapêuticas baseadas em suas propriedades anti-inflamatórias não são conhecidas na DA. Desse modo, avaliamos o efeito do tratamento farmacológico com a proteína recombinante Gal-1 (rGal-1) na imunomodulação da DA em modelo experimental murino. **Métodos:** Camundongos Balb/c machos foram imunizados por via subcutânea, com ovalbumina (OVA; 5 μ g) nos dias 0 e 7. Após a imunização, os animais foram desafiados com 250 μ g de OVA diluída em 50 μ L de óleo Johnson's Baby® nos dias 11, 14 a 18 e 21 a 24. Parte dos camundongos sensibilizados foram tratados intraperitonealmente com a proteína rGal-1 (0,3 ou 3 μ g/animal) ou dexametasona (1 mg/kg) diluídos em 0,1 mL de salina estéril, na última semana do protocolo experimental, dias 21 a 24 (uma vez ao dia). Após 24 horas do último período de exposição à OVA, ou apenas óleo (Sham), os animais foram anestesiados para coleta de sangue e, posteriormente, realizada a eutanásia por deslocamento cervical para coleta da pele e baço. As análises posteriores foram realizadas por meio de: análises histológicas e quantitativa de mastócitos e eosinófilos na pele, dosagens de IgE anti-ovalbumina e citocinas no sangue e lisado de pele, imuno-histoquímica e western blotting para detectar a expressão da Gal-1 e quinases da via MAPK na pele e baço. **Resultados:** O tratamento com rGal-1 diminuiu os sinais clínicos de dermatite nos camundongos BALB/c e diminuiu os níveis locais de eotaxina e IFN- γ . O tratamento também suprimiu a infiltração de eosinófilos e mastócitos, que foi corroborado pela redução da expressão da protease 6 dos mastócitos (mMCP6) e peroxidase dos eosinófilos (EPX). Estes efeitos locais estão associados com a ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e regulação negativa da Gal-1 endógena. A inibição da progressão da doença induzida por Gal-1 também foi relacionada com reduzidos níveis plasmáticos de IL-17, assim como o aumento de expressão de ERK fosforiladas em células esplênicas. **Conclusão:** Os nossos resultados demonstram que rGal-1 é um tratamento eficaz na inflamação alérgica de pele na DA e pode ter impacto sobre o desenvolvimento de novas estratégias em doenças inflamatórias da pele.

Palavras-chave: galectina-1, inflamação da pele, ovalbumina, mastócito, eosinófilo, ERK.

ABSTRACT

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is caused by both dysregulated immune responses and an impaired skin barrier. Although beta-galactoside binding protein galectin-1 (Gal-1) has immunomodulatory effects in several inflammatory disorders, therapeutic strategies based on its anti-inflammatory properties have not been explored in AD. Thus, we evaluated pharmacological treatment with recombinant Gal-1 protein (rGal-1) in the immunomodulation of AD in murine experimental model.

Methods: Male Balb/c mice were immunized with ovalbumin (OVA, 5µg) on days 0 and 7. After immunization, animals were challenged with 250µg OVA diluted in 50 µL Johnsons's Baby® oil on days 11, 14-18 and 21-24. A subset of animals was treated intraperitoneally with rGal-1 (0.3 or 3 µg/animal) or dexamethasone (1 mg/kg) diluted in 0,1 mL sterile saline, in last week of the experimental protocol, days 21-24 (once a day). After 24 hours of the last OVA challenge, or oil (Sham), animals were anesthetized for blood collection, and subsequently performed euthanasia by cervical dislocation for collection of skin and spleen. Subsequent analysis were performed by: histological analysis and quantification of mast cells and eosinophils in skin, dosage of IgE anti-OVA and cytokine levels in blood and skin homogenates, immunohistochemistry and western blot to detect Gal-1 and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) expression in skin and spleen.

Results: Treatment with rGal-1 decreased the clinical signs of dermatitis in BALB/c mice and diminished local eotaxin and IFN-γ levels. The treatment also suppressed the infiltration of eosinophils and mast cells, which was verified by reduced expression of mouse mast cell protease 6 (mMCP6) and eosinophil peroxidase (EPX). These localized effects are associated with extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation and downregulation of endogenous Gal-1. The inhibition of disease progression induced by rGal-1 was also correlated with reduced plasma IL-17 levels, as well as upregulation of phosphorylated ERK on splenic cells.

Conclusion: Our results demonstrate that rGal-1 is an effective treatment for allergic skin inflammation in AD and may impact the development of novel strategies for skin inflammatory diseases.

Key words: galectin-1, skin inflammation, ovalbumin, mast cell, eosinophil, ERK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pele fina de camundongo BALB/c.....	17
Figura 2 - Mecanismos imunológicos na patogênese da dermatite atópica (DA).....	19
Figura 3 - Expressão, secreção e funções das galectinas.	23
Figura 4 - Efeitos da Galectina 1 nas células do sistema imune.....	25
Figura 5 -Protocolo experimental de sensibilização epicutânea dos animais com OVA	30
Figura 6 - Modelo de medida de espessura	31
Figura 7 - Análise macroscópica da pele e eficácia do modelo experimental	38
Figura 8 - Efeito da rGal-1 na resposta imune sistêmica no modelo de DA	39
Figura 9 - Histopatologia da pele.....	41
Figura 10 - Efeito da rGal-1 na resposta imune local no modelo de DA.....	42
Figura 11 - Expressão da proteína Gal-1 na pele.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de anticorpos primários e respectivas diluição e fabricante.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: microgramas

µL: microlitros

µm: micrômetros

ANOVA: análise de variância

ALUM: adjuvante hidróxido de alumínio

BSA: soroalbumina bovina

CCL17: quimiocina 17 do tipo CC (cisteínas adjacentes)

CCL18: quimiocina 18 do tipo CC,

CCL22: quimiocina 22 do tipo CC,

CD11b: β2-integrina

CRD: Domínio reconhecedor de carboidrato (do inglês *Carbohydrate Recognition Domain*)

CSF: fatores estimuladores de colônia

DA: Dermatite Atópica

DAB: 3,3'-diamino benzidina

DC: Célula Dendrítica

Dex: Dexametasona

ECP: proteína catiônica dos eosinófilos (do inglês *Eosinophils Cationic Protein*)

EDN: neurotoxina derivada dos eosinófilos (de inglês *Eosinophil-Derived Neurotoxina*)

ELISA: ensaio de imuno absorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPX: peroxidase eosinofílica (do inglês *Eosinophil Peroxidase*)

ERK: quinase de sinal extracelular

FcεRI: receptor de alta afinidade para IgE

g: gramas

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Gal-1: galectina-1

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IL: interleucina

IgE: imunoglobulina E

INF-γ: Interferon-gama

i.p.: intraperitoneal

JNK: quinase c-Jun N-terminal

kDa: quilo Dalton

LC: Células de Langerhans

MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógenos

MBP: proteína básica principal (do inglês *Major Basic Protein*)

mg: miligramas

mL: mililitros

mm: milímetros

mM: massa molar

mMCP6: protease 6 de mastócito

NK: células matadoras naturais (do inglês *Natural Killer*)

PBS: tampão fosfato salina

RANTES: quimiocina regulada após ativação das células T normalmente expressa e secretada (do inglês *Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and presumably Secreted*)

rGal-1: Galectina-1 recombinante

SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida

S.E.M: Erro padrão da media (do inglês *Standard Error of Mean*)

TGF β : fatores de crescimento mesenquimal

Th: Linfócitos T auxiliaries (do inglês *T helper*)

TNF- α : fator- α de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor-alpha*)

u.a.: unidades arbitrárias

VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1

WOA: Organização Mundial de Alergia

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	Pele	16
1.2.	Dermatite Atópica	17
1.3.	Galectina-1	22
2.	OBJETIVOS	26
2.1.	Objetivo Geral.....	26
2.2.	Objetivos Específicos	26
3.	MATERIAS E MÉTODOS.....	29
3.1.	Animais.....	29
3.2.	Modelo experimental de dermatite atópica e protocolos de tratamentos farmacológicos	29
3.3.	ELISA: dosagem de IgE anti-ovalbumina e Gal-1	30
3.4.	Análise histológica e quantificação das células inflamatórias na pele	30
3.5.	Imuno-histoquímica	31
3.6.	Western blotting.....	32
3.7.	Análise de citocinas/quimiocinas por painel multiplex	34
3.8.	Análises estatísticas	35
4.	RESULTADOS	37
4.1.	O tratamento farmacológico com rGal-1 reduz lesões cutâneas de forma dose dependente	37
4.2.	rGal-1 e Dex regulam os níveis sistêmicos de IL-17 e ativam a fosforilação de ERK..	38
4.3.	Efeito da rGal-1 na resposta inflamatória da pele	39
4.4.	A DA induz aumento da expressão da proteína Gal-1, efeito revertido pelos tratamentos farmacológicos.....	42
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES	51
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8.	APÊNDICES.....	59
	Apêndice A – Comitê de Ética em Pesquisa.....	59
	Apêndice B – Manuscrito.....	61
	Anti-Inflammatory Effect of Galectin-1 in a Murine Model of Allergic Dermatitis	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele

A pele representa o maior órgão do corpo e corresponde de 15 a 20% do peso corporal humano. É composta por duas camadas com origens embriológicas distintas: a epiderme, derivada do ectoderma, e a derme, originada do mesoderma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ROSS; PAWLINA, 2016). Além disso, na pele também observamos a presença de anexos epidérmicos que incluem folículos pilosos e pelos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, unhas e glândulas mamárias.

A epiderme é composta de um epitélio estratificado pavimento queratinizado e suas células consistem em queratinócitos (mais abundantes), melanócitos (produtoras de melanina), células de Langerhans (sinalização do sistema imune) e células de Merkel (associadas às terminações nervosas sensoriais). Sua espessura e estrutura variam de acordo com o local, podendo ser mais complexa nas regiões de pele espessa, como nas palmas das mãos e solas dos pés, na qual é possível distinguir suas diferentes camadas: estratos basal, espinhoso, granular, lúcido e córneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ROSS; PAWLINA, 2016).

Aderida à epiderme, a derme é composta de tecido conjuntivo que confere suporte mecânico, força e espessura à pele. É dividida em duas camadas com limites brandos, sendo a papilar mais superficial e a reticular mais profunda. A camada papilar possui tecido conjuntivo frouxo e forma as papilas dérmicas. A camada reticular é espessa e formada por tecido conjuntivo denso. As duas camadas são ricas em fibras elásticas e colágenas, vasos sanguíneos e nervos (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Devido a porção queratinizada da epiderme, há proteção do organismo contra a perda de água. Além disso, a pele participa da termorregulação do organismo através de vasos sanguíneos, tecido adiposo e glândulas sudoríparas, que também excretam substâncias e, também, é responsável pela transmissão de impulsos nervosos sensoriais para o sistema central, pois recebe informações do ambiente. A melanina, pigmento produzido na epiderme tem função de proteção dos raios ultravioletas do sol (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A pele de camundongo apresenta padrão histológico similar aos humanos, constituindo um bom modelo para estudos experimentais que envolvam esse órgão (Figura 1).

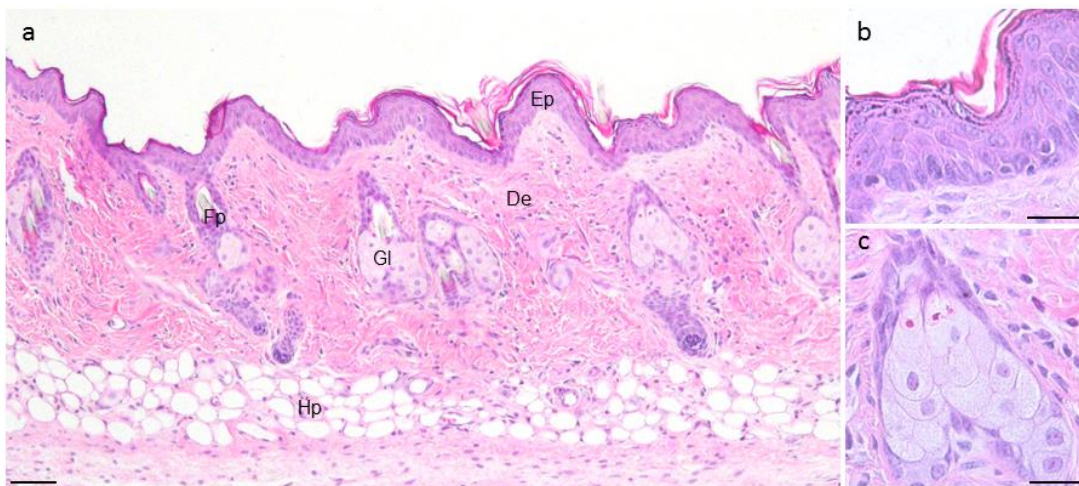


Figura 1. Pele fina de camundongo BALB/c. [a] Epiderme (Ep). Derme (De). Na derme, observam-se folículos pilosos (Fp) e glândulas sebáceas (Gl). Abaixo da derme está a hipoderme (Hp), constituída por tecido adiposo. [b] Epiderme constituída pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. [c] Detalhe de glândula sebácea evidenciando seu epitélio glandular fracamente eosinofílico e núcleo de posição central. Coloração: Hematoxilina e eosina. Barras: 100 µm [a], 50 µm [b, c].

1.2. Dermatite Atópica

A dermatite atópica (DA), também conhecida como eczema atópico, representa a inflamação crônica mais comum da pele e possui uma crescente prevalência no mundo. Dados da Organização Mundial da Alergia de 2014 (WOA, 2014), afirmam que 5% das crianças são acometidas pela DA e a prevalência na idade adulta pode chegar a 10%.

Macroscopicamente, as características da DA incluem lesões avermelhadas que coçam muito, descamam e às vezes ficam úmidas. Possui uma evolução crônica ou com recidivas, com início geralmente precoce, mas, em alguns casos, há o desenvolvimento tardio (início na idade adulta) (LEUNG; GUTTMAN-YASSKY, 2014; SCHLAPBACH; SIMON, 2014). Além disso, os pacientes muitas vezes são acometidos pela insônia, diminuição do rendimento escolar ou produtividade, sofrimento emocional e redução da qualidade de vida (MODENA; DAZY; WHITE, 2016). As características histológicas da DA variam de acordo com o estágio da doença. É observado na DA espessamento da epiderme e fibrose na derme acompanhada da infiltração de linfócitos, eosinófilos e aumento do número de mastócitos (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2012).

A DA é uma doença complexa de origem genética, com etiologia multifatorial, e seus portadores apresentam maior incidência de infecções bacterianas, fúngicas ou virais devido à quebra da barreira epitelial nas lesões cutâneas. Existem duas variações desta doença: dermatite atópica extrínseca e a dermatite atópica intrínseca. A primeira representa a maior parte dos diagnósticos de DA (80%) e está associada aos níveis elevados de IgE sérica. Em contraste, os pacientes com DA intrínseca tem níveis baixos ou normais de IgE (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2012; MODENA; DAZY; WHITE, 2016)

Os tratamentos para DA incluem emolientes, glicocorticoides tópicos como a dexametasona, inibidores de calcineurina, fototerapias, e imunossupressores tais como ciclosporina A, que são eficientes na redução da inflamação, mas podem causar efeitos adversos, como o surgimento de neoplasias malignas na pele (LUGER et al., 2015). Os corticosteroides são a primeira linha de tratamento em pacientes com DA e, destacamos a dexametasona, um glicocorticosteroide com ação anti-inflamatória. Os glicocorticóides são hormônios e possuem efeitos adversos, podendo promover o surgimento de resistência periférica a insulina (RAFACHO et al., 2007; MIZUNO et al., 2015). Portanto, o desenvolvimento de novas terapias é necessário para o tratamento dessa patologia.

O diagnóstico clínico para a DA ainda não é totalmente estabelecido, sendo mais utilizado na clínica o criado por Hanifin e Rajka em 1980 (critério HR) que incluem lesões eczematosas na pele em padrões típicos de idades específicas (início abaixo dos 2 anos), que são crônicas e recorrentes, com início precoce, além do histórico familiar para atopias (asma, rinite e dermatite atópica) e prurido. A avaliação dos níveis totais e específicos de IgE no soro também são usados para auxiliar no diagnóstico, assim como a contagem de eosinófilos. Entretanto, diversas vezes é necessária a utilização de testes invasivos para a conclusão do diagnóstico (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2012; WATSON; KAPUR, 2011).

A patogênese da DA é atribuída a um desequilíbrio no sistema imune adaptativo caracterizada pela disfunção dos linfócitos T auxiliares (Th) e aumento da produção de IgE e, conseqüentemente, quebra da barreira epitelial com intensa perda de água (pele seca) e entrada de substâncias nocivas (DHINGRA; GULATI; GUTTMAN-YASSKY, 2013, SCHLAPBACH; SIMON, 2014).

As citocinas e quimiocinas, tais como interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-13, eotaxinas, CCL17, CCL18 e CCL22, produzidas por células Th2 e células dendríticas estimulam a infiltração de mastócitos e eosinófilos na pele. Linfócitos de perfil Th2 e Th17 predominam em pacientes com DA, mas as células Th1 também contribuem para sua patogênese. As citocinas produzidas por células Th2 e Th17 (IL-4/IL-13 e IL-17/IL-22, respectivamente) inibem a diferenciação terminal da epiderme e contribuem para quebra da barreira epitelial em pacientes com DA (Figura 2) (DHINGRA; GULATI; GUTTMAN-YASSKY, 2013; LEUNG; GUTTMAN-YASSKY, 2014; SCHLAPBACH; SIMON, 2014).

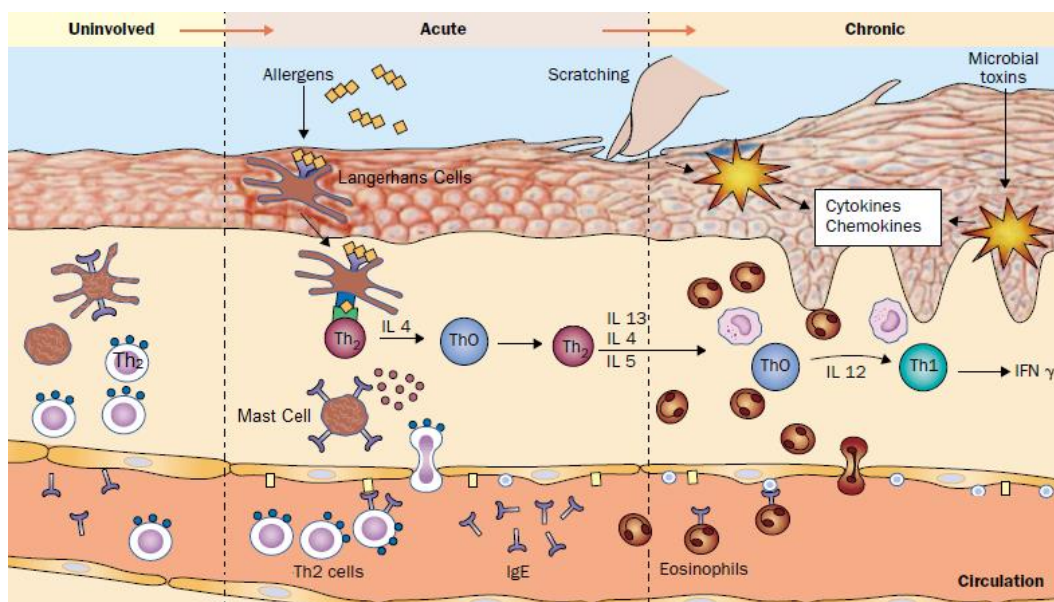


Figura 2 - Mecanismos imunológicos na patogênese da dermatite atópica (DA). No primeiro esquema observamos uma pele saudável. Na etapa seguinte, com a quebra da barreira epidérmica, há aumento da permeabilidade de antígenos, que se deparam com as células de Langerhans (LC), que por sua vez ativam as células T helper tipo 2 (Th2) para produzir citocinas IL-4 IL-5 e IL-13. As células dendríticas (DCs) migram para os gânglios linfáticos, onde ativam as células T efectoras e induzem a produção de IgE. As citocinas e quimiocinas produzidas por células Th2 e DCs estimulam a infiltração de DCs, mastócitos e eosinófilos na pele. Células Th2 e Th22 predominam em pacientes com DA, mas as células Th1 e Th17 também contribuem para sua patogênese, assim como a produção de INF- γ . As citocinas Th2 e Th22 (IL-4 / IL-13 e IL-22, respectivamente) inibem a diferenciação terminal da epiderme e contribuem para quebra da barreira epitelial em pacientes com DA e a instalação de infecções secundárias. Adaptado de (Leung e Bieber, 2003).

Como demonstrado na figura 2, a modulação das respostas inflamatórias na DA ocorre em grande parte pela ação de citocinas, que são polipeptídeos multifuncionais

de 8 a 30 kDa, sintetizados por diferentes células do sistema imune. Devido as suas características, elas são divididas em subgrupos: interleucinas (IL, sendo numeradas sequencialmente), fatores de necrose tumoral (TNF), fatores estimuladores de colônia (CSF), interferons (INF), fatores de crescimento mesenquimal (TGF β) e quimiocinas (citocinas quimioatraentes) (de OLIVEIRA et al., 2011; DELVES et al., 2013). As citocinas são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam especialmente por mecanismos parácrinos (células vizinhas) e autocrino (na própria célula produtora). Diversas células secretam a mesma citocina, e uma citocina pode agir em diversos tipos celulares e apresentar diferentes funções, fenômeno chamado de pleiotropia. Assim, as citocinas influenciam a diferenciação, atividade, sobrevivência e proliferação da célula, assim como a atividade de outras citocinas que podem atenuar (anti-inflamatórias) ou acentuar (pró-inflamatórias) a resposta inflamatória (de OLIVEIRA et al., 2011; DELVES et al., 2013).

Dentre os subgrupos de citocinas, as quimiocinas se destacam nas respostas inflamatórias por serem responsáveis pela quimiotaxia de células imunes. Particularmente nas reações alérgicas, 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. (DESHMANE et al., 2009).

Dentre os tipos celulares que atuam na patogênese da DA, destacam-se os mastócitos, células residentes do tecido conjuntivo. Essas células são localizadas próximos aos vasos sanguíneos, e são mais predominantes em áreas expostas ao ambiente externo como a pele, o epitélio pulmonar e o trato gastrointestinal e estão em maior número nas inflamações alérgicas (CRUSE; BRADDING, 2016; MODENA; DAZY; WHITE, 2016). Apresentam citoplasma com grânulos que se coram metacromaticamente por corantes básicos, como o azul de toluidina. A ligação cruzada dos alérgenos com a IgE ligada aos receptores Fc ϵ RI (receptor de alta afinidade para a região Fc da IgE) na superfície dos mastócitos, desencadeia sua desgranulação imediata, com a liberação dos mediadores pré-formados e estocados

em seus grânulos citoplasmáticos. Dentre esses mediadores destacam-se histamina, heparina, proteases triptase, quimase e carboxipeptidase, fatores quimioatraentes de neutrófilos e eosinófilos. Uma vez liberados, esses mediadores são capazes de potencializar a migração e a proliferação de células, além de induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais ativando o recrutamento leucocitário (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005; IRKEC; BOZKURT, 2012; MODENA; DAZY; WHITE, 2016).

Além disso, os mastócitos secretam substâncias que são geradas logo após a sua ativação, que são chamados de fatores neoformados. Elas são originadas pela ativação da fosfolipase A2 e derivados do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos, que potencializam os efeitos dos já liberados, prolongando suas ações no tecido. Os mastócitos da pele humana também sintetizam fatores neo-sintetizados e liberam IL-17 e IL-22, importantes citocinas que atuam na patogênese da DA (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005; MASHIKO et al., 2015; WERFEL et al., 2016).

A conexão entre doenças alérgicas e eosinófilos é antiga, apesar de até meados dos anos 1980 supunha-se que elas possuíssem ação anti-inflamatória. O conceito foi mudado após o conhecimento da alta toxicidade das proteínas contidas em seus grânulos, para os helmintos e células do sistema respiratório. Hoje, são considerados células pró-inflamatórias que medeiam as manifestações das doenças alérgicas, como a asma. Também medeiam as doenças inflamatórias alérgicas. Quando 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 (IRKEC; BOZKURT, 2012). A eosinofilia é um achado típico em algumas doenças inflamatórias da pele como a DA, na qual nota-se uma correlação positiva entre o número de eosinófilos e gravidade da doença. Já foi discutido em trabalhos que a interação dos eosinófilos e outras células inflamatórias na pele, levam a ativação dos nervos, o que exacerba o prurido na DA (RAAP; KAPP, 2010; WERFEL et al., 2016).

De fato, na DA é observado um aumento das proteínas dos grânulos eosinofílicos indicando uma ativação completa dos eosinófilos, que têm seus níveis aumentados na DA. Os eosinófilos podem se comunicar com outros tipos celulares através de uma variedade de sinais específicos como, também, liberar citocinas e

quimiocinas depois de ativados. Sua característica marcante são seus grandes grânulos específicos que liberam proteínas como a proteína básica principal (MBP), principal componente do grânulo, rica em arginina. Na matriz, acumulam-se a peroxidase eosinofílica (EPX) e as ribonucleases, conhecida como proteína catiônica dos eosinófilos (ECP) e a neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN) (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005; DARSOW; RAAP; STÄNDER, 2014). Trabalhos descrevem que em pacientes com DA, foi observado a presença da EPX em grandes quantidade (FOSTER et al., 2011)

As respostas celulares desencadeadas durante a reação alérgica são, também, controladas por diferentes cascatas de sinalização, destacando-se a participação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) que contribuem para o recrutamento leucocitário, ativação dos mastócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias e diferenciação de linfócitos de perfil Th2 e Th17 (PELAIA et al., 2005; ACCIANI et al., 2016). Em mamíferos, três famílias distintas de MAPKs são descritas e incluem as quinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38 (ABBAS; LICHTAMN; PILLAI, 2015).

1.3. Galectina-1

As galectinas são caracterizadas pela sua afinidade aos β -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 (COMPAGNO et al., 2014). Em mamíferos, 15 membros dessa família foram descritos e clonados. 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).

As galectinas não possuem uma sequência-sinal clássica e, com isso, podem ser secretadas por mecanismos pouco conhecidos (HUGHES, 1997; DELACOUR; KOCH; JACOB, 2009). São encontradas no citoplasma e núcleo, mas também no meio extracelular e na superfície celular. As galectinas atuam no meio extracelular através da ligação com glicoproteínas ou glicolipídeos, e desencadeiam vias de sinalização intracelulares, regulando interações célula-célula e célula-matriz extracelular (PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998; VASTA et al., 2012) (Figura 3). No meio intracelular, estas proteínas podem ser transportadas do núcleo para o citoplasma e participar de processos fundamentais como a remodelação de pré-mRNA (RNA mensageiro), assim como a regulação da mitose, apoptose e progressão do ciclo celular (LIU; RABINOVICH, 2005; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

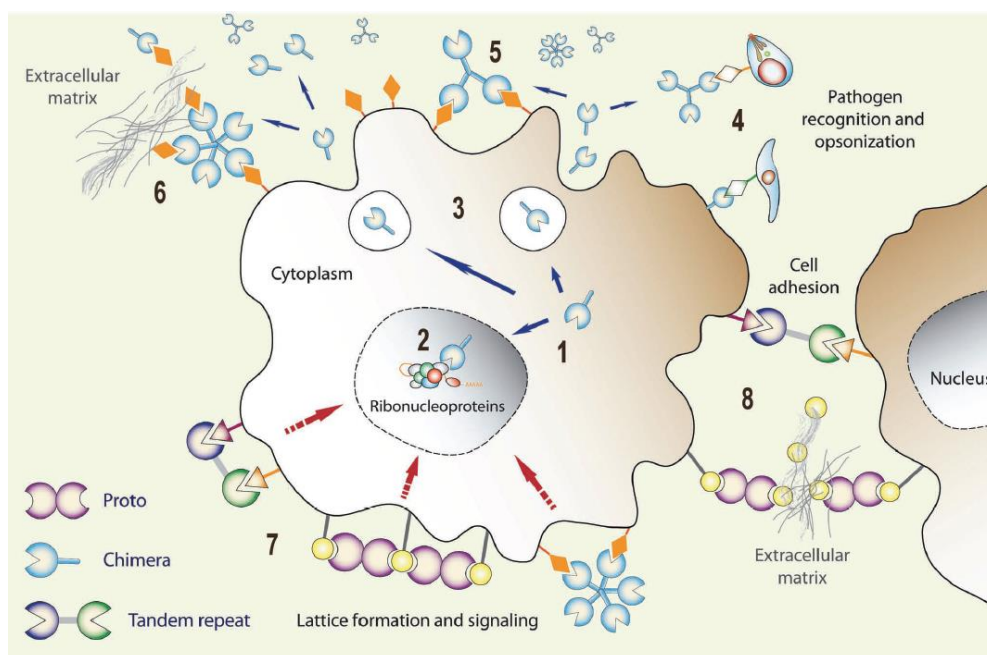


Figura 3 - Expressão, secreção e funções das galectinas. Os transcritos das galectinas são traduzidos no citoplasma (1) e as proteínas podem ser translocadas para o núcleo (2), local onde se associam com ribonucleoproteínas. Via mecanismos não convencionais, as galectinas são secretadas para o meio extracelular (3), atuando como receptores de reconhecimento padrão para polissacarídeos microbianos (4) ou presentes na superfície celular (5) e, assim, mediando a migração celular por meio da ligação com a matriz extracelular (6). Ainda, na superfície celular as galectinas podem formar agrupamentos e microdomínios (7) que desencadeiam cascatas de sinalização e também promover interações/adesão célula-célula (8). Figura retirada de (Ablamowicz e Nichols, 2016), *Frontiers in Immunology*, 3:199, 2012

A expressão da Gal-1 foi observada em várias células relacionadas com a resposta inflamatória, especialmente neutrófilos e mastócitos, 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., 2006) sugerindo um importante papel na geração e manutenção da tolerância imunológica (Figura 4). 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- α de necrose tumoral (TNF- α), carragenina e zymosan (RABINOVICH et al., 2002).

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) (LA et al., 2003; COOPER; NORLING; PERRETI, 2008; GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Nos modelos *in vitro* a incubação com a rGal-1 inibiu a migração dos neutrófilos e linfócitos humanos (NORLING et al., 2008) através das células endoteliais após estímulo inflamatório com a citocina IL-8 ou TNF- α , respectivamente. Nas investigações dos modelos *in vivo*, os efeitos da rGal-1 foram associados com a inibição da desgranulação dos mastócitos na pata de ratos após administração da fosfolipase A₂ 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., 2006), do zymosan (GIL; GULLO; OLIANI, 2010) e da IL-1 β 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 β 2-integrina) na superfície dos leucócitos (COOPER; NORLING; PERRETI, 2008; NORLING et al., 2008; GIL; GULLO; OLIANI, 2010) e não às relacionadas ao endotélio (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) (NORLING et al., 2008).

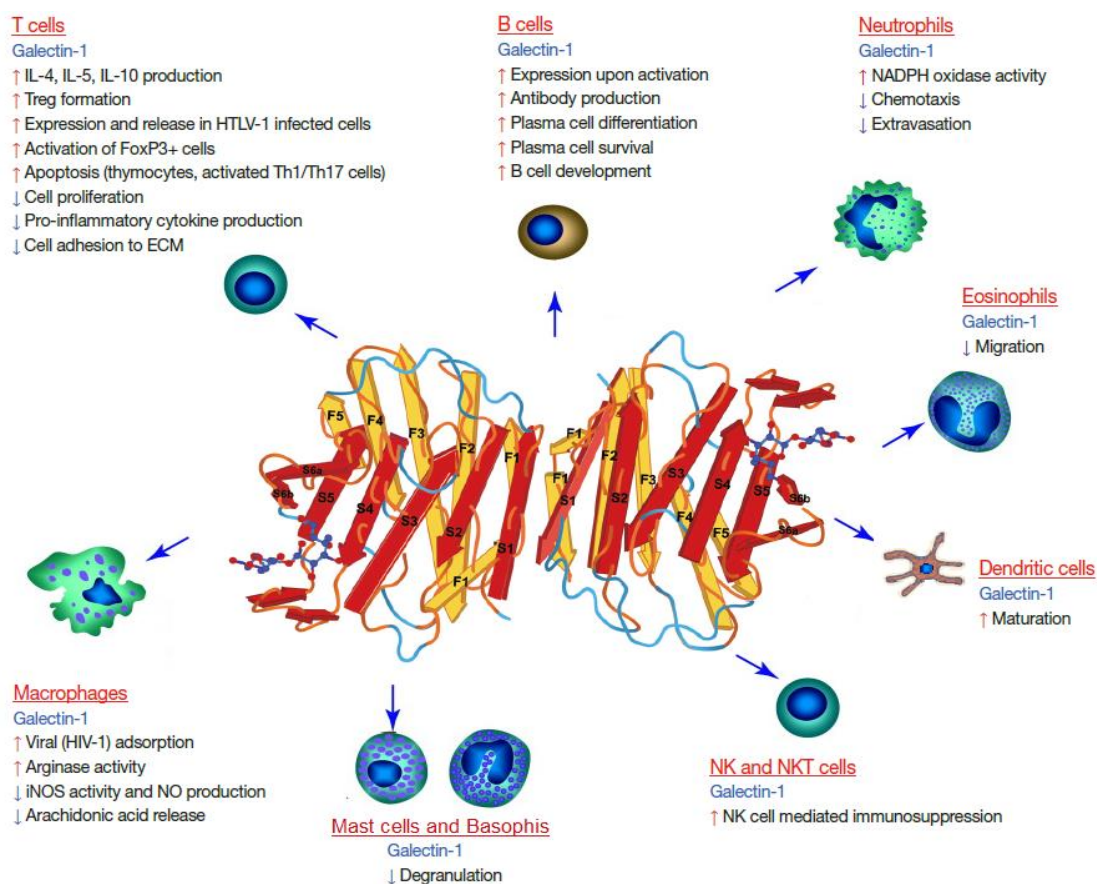


Figura 4 – Efeitos da Galectina 1 nas células do sistema imune. As setas vermelhas indicam ações regulatórias positivas da Gal-1, enquanto as azuis indicam ações negativas. Figura retirada de (Than et al, 2015, modificado).

Mais recentemente, demonstramos em estudos com modelo experimental de conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina em camundongos, o efeito inibitório da rGal-1 na produção de IL-4, IL-13 e eotaxina pelos linfonodos, associados com diminuição dos sinais clínicos da doença e produção de IgE anti-ovalbumina (MELLO et al., 2015). Além disso, os estudos mostraram número reduzido de mastócitos na conjuntiva bulbar na fase tardia da resposta alérgica, indicando um papel regulatório da rGal-1 na atividade desse tipo celular. No entanto, os mecanismos pelos quais a Gal-1 modula as respostas celulares nos processos inflamatórios alérgicos ainda não estão completamente determinados, especialmente na pele.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o papel da proteína Gal-1 no modelo experimental de dermatite atópica induzida em camundongos pela ovalbumina.

2.2. Objetivos Específicos

I) avaliar o mecanismo de ação e o efeito anti-inflamatório da Gal-1 recombinante (rGal-1) na DA induzida pela ovalbumina, e comparar com o tratamento pela dexametasona, por meio de:

- análise macroscópica e da espessura da pele;
- dosagem da imunoglobulina E (IgE) anti-ovalbumina no plasma;
- análise histológica e quantitativa dos mastócitos e eosinófilos na derme;
- dosagens de citocinas e quimiocinas no plasma e macerados de pele;
- expressão da quinase regulada pelo sinal extracelular (ERK) nos macerados de pele e baço.

II) avaliar a expressão endógena da proteína Gal-1 na pele dos animais nas diferentes condições experimentais, por meio de imuno-histoquímica e ELISA.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAS 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, de seis a oito semanas de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas (n = 3 animais), em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C), e receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFESP (Processo número 1906060115/2015).

3.2. Modelo experimental de dermatite atópica e protocolos de tratamentos farmacológicos

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais (n = 6/grupo): Naive, Sham, dermatite atópica (DA), DA tratado com rGal-1 (DA+rGal-1) e DA tratado com dexametasona (DA+Dex). Os animais foram imunizados nos dias 0 e 7 com injeção subcutânea de 5 µg de ovalbumina (OVA; grau V; Sigma-Aldrich, EUA) e 10 mg/mL do adjuvante hidróxido de alumínio (ALUM; Sigma-Aldrich) diluídos em 200 µl de solução salina estéril, de acordo com estudos prévios modificados (KIM et al., 2012; MELLO et al., 2015). No 11º dia os animais tiveram o dorso depilado e foram desafiados com 250 µg de OVA diluída em 50µl do óleo Johnson's Baby® nos dias 11, 14 a 18 e 21 a 24. Os animais Sham receberam somente salina estéril (dias 0 e 7) e óleo (dias 11, 14-18, 21-24), enquanto os Naive foram apenas manipulados.

Parte dos camundongos sensibilizados com OVA foram tratados com injeção intraperitoneal na última semana do protocolo experimental com a proteína Gal-1 recombinante (rGal-1; Peprtech, EC Ltd, London, UK) na concentração de 0,3 µg ou 3 µg por animal, ou com dexametasona (1 mg/kg, Sigma-Aldrich) (MELLO et al., 2015), diluídos em 0,1 mL de salina estéril por 4 dias (uma vez ao dia). O grupo DA foi tratado somente com salina estéril (Figura 5).

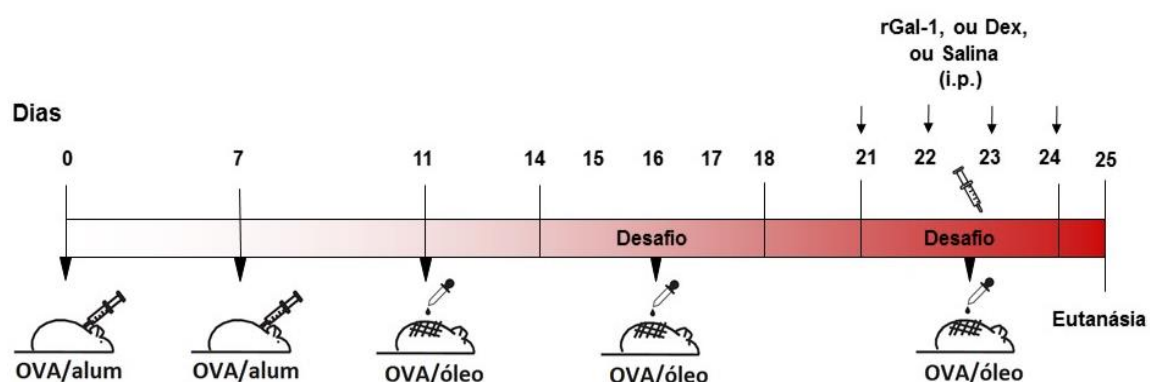


Figura 5 -Protocolo experimental de sensibilização epicutânea dos animais com OVA.

Após 24 horas do último período de exposição com OVA ou salina (Sham), os animais foram anestesiados i.p. com cloridrato de cetamina (100 mg/kg; Cetamin/Syntec) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg; Xialazin/Syntec), submetidos à punção cardíaca para obtenção de sangue em seringa previamente preparada com citrato de sódio (3,8%). Em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical para coleta da pele e baço.

3.3. ELISA: dosagem de IgE anti-ovalbumina e Gal-1

Amostras de sangue coletadas dos animais nas diferentes condições experimentais foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos para separação do plasma. Para dosagem de IgE anti-OVA plasmática foi utilizado kit comercialmente disponível (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Para avaliação dos níveis de Gal-1, as peles foram homogeneizadas como descrito no item 3.6 e utilizado o kit comercialmente disponível (RayBiotech, Norcross, GA, USA), seguindo instruções do fabricante. Todas as estimações foram feitas em duplicata e os resultados demonstrados como média \pm S.E.M. de proteína (ng/mL).

3.4. Análise histológica e quantificação das células inflamatórias na pele

As peles foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado por 24 horas. Após, as amostras foram lavadas em água corrente, desidratadas em uma série crescente

de etanol e, incluídas em parafina. Cortes de 3 μm foram obtidos no micrótomo Leica RM2155, desparafinizados e corados pela hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica e quantificação dos eosinófilos, e pelo azul de toluidina a 0,5% para quantificação dos mastócitos.

As células foram quantificadas utilizando-se objetiva de 40X no microscópio ZEISS, modelo AXIO SCOPE.A1, do Laboratório de Histologia, UNIFESP, São Paulo, SP. As áreas de cada tecido foram obtidas com o auxílio do software analisador de imagem Axiovision 4.8 (ZEISS). Os valores são demonstrados como média \pm S.E.M. do número de células por mm^2 de três cortes semi-seriados, com distância de 12 μm entre cada secção.

A espessura da pele também foi avaliada utilizando-se fotomicrografias tiradas com a objetiva de 10X do microscópio ZEISS AXIO SCOPE.A1. Para cada animal foram realizadas três medidas aleatórias da epiderme+derme, como ilustrado na Figura 6. Os valores foram demonstrados como média \pm S.E.M. das espessuras (milímetros) obtidas nos diferentes grupos experimentais ($n = 6$ animais/ grupo).

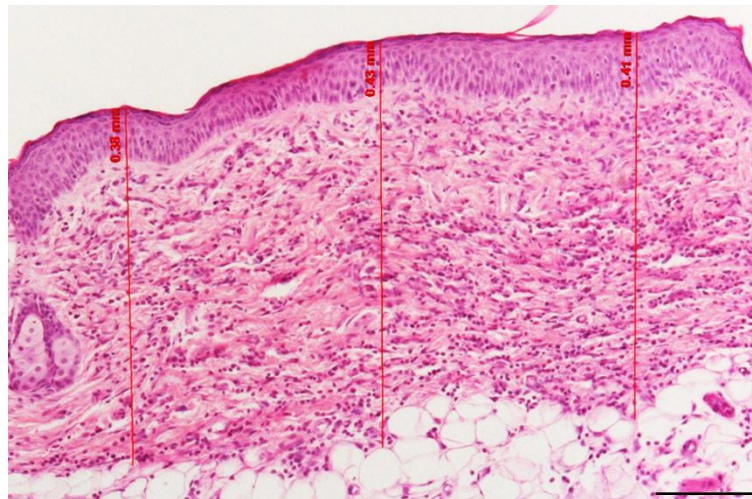


Figura 6 - Modelo de medida de espessura. Medida realizada na pele nos animais de diferentes grupos experimentais. Barra: 200 μm

3.5 Imuno-histoquímica

Para a investigação da expressão da proteína endógena Gal-1 na pele dos camundongos, foram utilizados cortes de 3 μm preparados em lâminas silanizadas a 4%. Após o processo de desparafinização em xilol e re-hidratação em álcoois

graduados (etanol absoluto, 85% e 50%), foi efetuada a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 em panela à vapor a 96°C, durante 30 minutos. As secções foram lavadas com água destilada e, posteriormente, realizada 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), foi realizada a incubação do material com o anticorpo policlonal *rabbit* anti-Gal-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), na diluição 1:200 em soroalbumina 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 utilizando sistema de detecção estreptavidina/biotina/peroxidase (Histostain SP kit HRP, Invitrogen) seguindo instruções do fabricante, e revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Após esta reação, os fragmentos 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) na epiderme e derme por meio de fotomicrografias (n = 3 campos/animal) 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 30 pontos imunorreativos para Gal-1 nas células epiteliais e matriz extracelular da derme. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M.

3.6. Western blotting

As peles e os baços foram homogeneizados em microtubos contendo coquetéis completos de inibidores de proteases livre de EDTA e de inibidores de fosfatases (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), diluídos em 500 μ L (pele) e 700 μ L (baço) de solução tampão de lise (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM) e 1% de Triton-x, pH 7,4. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos, e os sobrenadantes armazenados a -80°C. Para as dosagens da concentração de proteínas presentes nos sobrenadantes, foi utilizado o ensaio de Bradford (Bio-Rad Laboratories, USA).

Posteriormente, as alíquotas dessas amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Bio-Rad Laboratories, USA) na proporção 1:1 e as proteínas desnaturadas em banho seco a 100°C por 5 minutos. As análises foram realizadas utilizando-se pools de amostras (pele ou baço) por grupo (n = 3 animais/ grupo). Os pools (30 µg de proteína) e os marcadores de peso molecular (Bio-Rad Life Science, USA) foram separados em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio – gel de poliácridamida a 12%) e, posteriormente, transferidas para membrana de nitrocelulose ECL Hybond. Para verificar a eficácia da transferência das proteínas, as membranas foram coradas em Ponceau-S a 0,1% em ácido acético a 5% (Santa Cruz Biotechnology). Para a detecção das diferentes proteínas na membrana foram utilizados anticorpos primários policlonais descritos na tabela.

Tabela 1. Relação de anticorpos primários e respectivas diluição e fabricante.

Anticorpo	Diluição	Fabricante
<i>Rabbit</i> anti-ERK2	1:5000	Cell Signaling, Danvers, MA, EUA
<i>Mouse</i> anti-p-ERK 1/2	1:2000	
<i>Goat</i> anti-mMCP6 (protease 6 de mastócito)	1:5000	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Goat</i> anti-EPX (Peroxidase eosinofílica)	1:200	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
<i>Goat</i> anti-Integrina αM (CD11b)	1:200	
<i>Rabbit</i> anti-GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	1:5000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA

Todos os anticorpos foram diluídos em TBS-Tween 20 a 0,1 %, e incubados *overnight* a 4°C. Após lavagem por 15 minutos em TBS, as membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 60 minutos com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase *goat* anti-*rabbit* IgG, *rabbit* anti-*goat* (1:2000; Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, MI, USA) ou *goat* anti-*mouse* (1:5000; Millipore Corporation, Temecula, CA USA), lavadas em TBS (15 minutos) e, reveladas por amplificação quimioluminescente (Westar Nova 2.0 chemiluminescent substrate kit; Cyanagen, Bologna, Italy) no equipamento GeneGnome5 (SynGene, Cambridge, U.K.). A análise da expressão das proteínas foi realizada por densitometria (unidades arbitrárias)

usando o software GeneTools (SynGene) para determinar a expressão relativa de EPX, CD11b ou mMCP6/GAPDH ou p-ERK/ERK total.

3.7 Análise de citocinas/quimiocinas por painel multiplex

Para análise de citocinas e quimiocinas no plasma e homogeneizados de pele dos animais nas diferentes condições experimentais, utilizamos o painel multiplex MT17MAG47K-PX25 (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e o equipamento LUMINEX xMAP MAGPIX (Millipore Corporation, 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.

Sete analitos foram avaliados: Eotaxina, RANTES, IL-4, -10, -13, -17 e interferon- γ (IFN- γ). 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 a realização das dosagens, o sangue e as peles foram coletadas como descrito anteriormente, e após a coleta, macerados (apenas as peles) e 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 μ 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 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos, e os sobrenadantes armazenados a - 80°C em novos microtubos para serem utilizados posteriormente.

Para 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 μ L dos padrões, soluções controle e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada previamente com o tampão de lavagem. Em seguida, 25 μ L de *assay buffer* foi adicionado às amostras e aos padrões e, 25 μ L de *beads* magnéticas revestidas com anticorpos específicos (MT17MAG47K-PX25, MILLIPLEX MAP, Millipore Corporation, EUA) adicionados em todos os poços (controles, padrões e amostras). A placa foi selada, revestida com papel alumínio e incubada *overnight* a 4°C, sob agitação. No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes

com 200µL de tampão de lavagem e, incubada com 25 µL de anticorpo de detecção ligado a biotina à temperatura ambiente, por 1 hora sob agitação. Para completar a reação, 25 µL 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 µL 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

Os dados foram analisados utilizando o software *GraphPad* versão 5.00. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para determinar a normalidade dos dados. Para amostras com distribuição normal, foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para amostras com distribuição não normal, aplicamos o teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de Dunn. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 O tratamento farmacológico com rGal-1 reduz lesões cutâneas de forma dose dependente

Inicialmente, avaliamos a resposta inflamatória alérgica pelas análises macroscópicas da pele dos animais no último dia do protocolo experimental (dia 24). O grupo DA apresentou peles com sinais de vermelhidão e lesões, comparados aos grupos controles (Naive e Sham), indicando processo inflamatório induzido pelo desafio com OVA (Figuras 7A-C). O tratamento com 0,3 µg de rGal-1 não mostram alteração macroscópica em relação ao grupo DA (Figura 7D). No entanto, os animais tratados com 3 µg de rGal-1 e Dex (Figuras 7E-F) apresentaram peles com aspecto semelhante aos animais controles (Figuras 7A-B). A observação macroscópicas corroboram com as análises da espessura da pele que mostram aumento significativo no grupo DA e DA+rGal-1 0,3µg em relação aos grupos controles, e redução nos tratados com rGal-1 3 µg e Dex (Figura 7G).

Após 24 horas da última exposição à OVA, os animais sensibilizados dos grupos DA, tratados ou não, aumentaram significativamente os níveis plasmáticos de IgE anti-OVA em relação aos controles (Naive e Sham), confirmando a eficácia do modelo experimental (Figura 7H).

Considerando os resultados macroscópicos mais efetivos após tratamento com rGal-1 na concentração de 3µg/animal, as análises posteriores foram realizadas com essa dosagem.

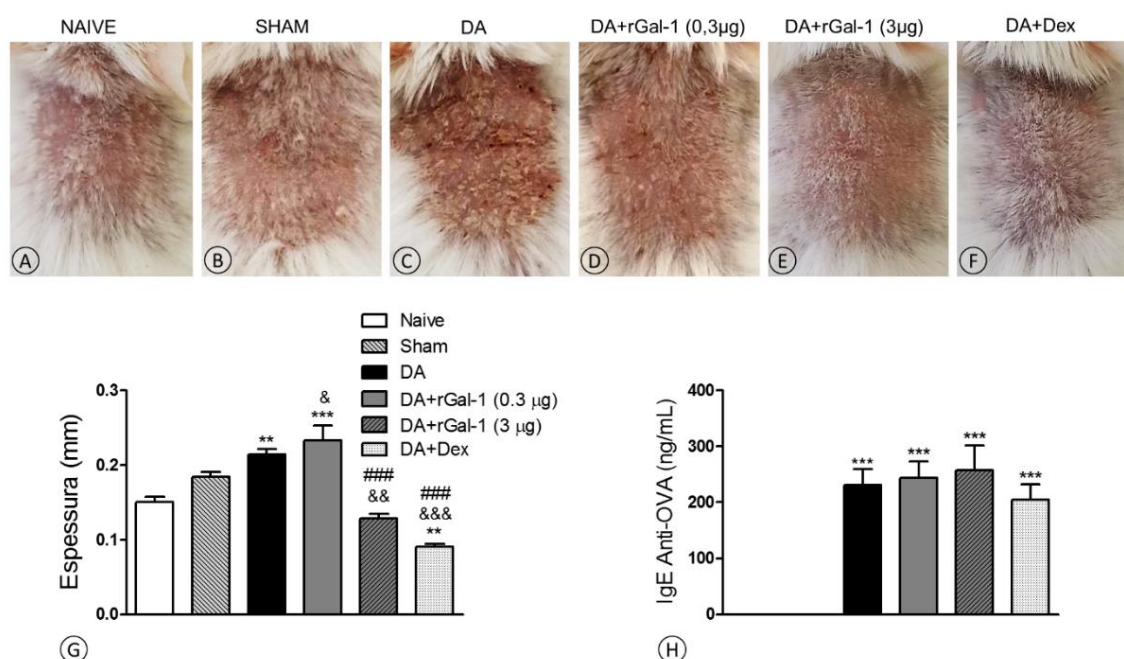


Figura 7 – Análise macroscópica da pele e eficácia do modelo experimental. A-F: Os animais do grupo DA [C] tratados ou não com rGal-1 0,3 µg [D] apresentam sinais de vermelhidão e lesões na pele, enquanto os tratados com rGal-1 3 µg [E] ou dexametasona (Dex) [F] mostram padrão semelhante aos controles [A-B]. G: Espessura da pele. H: dosagem de IgE anti-ovalbumina no plasma. Os dados representam as médias \pm SEM da espessura da pele (mm) e dos níveis da IgE (ng/mL) nos diferentes grupos experimentais (n = 6). **P<0,01; ***P<0,001 vs Naive; &P<0,05; &&P<0,01; &&&P<0,001 vs Sham; ###P<0,001 vs DA e DA+rGal-1(0,3µg) (ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

4.2 rGal-1 e Dex regulam os níveis sistêmicos de IL-17 e ativam a fosforilação de ERK

As dosagens de citocinas plasmáticas IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17 foram realizadas por painel multiplex para avaliar o efeito sistêmico do tratamento com rGal-1 comparando seus resultados com Dex.

Não detectamos diferenças significantes nos níveis de IL-4, IL-13 e IL-10 entre os grupos (Figuras 8A-C). No entanto, os tratamentos com rGal-1 e Dex diminuíram significativamente os níveis de IL-17 quando comparados com o grupo DA (Figura 8D).

Para compreender a sinalização molecular sistêmica que envolve os efeitos do tratamento com rGal-1 na DA, nós analisamos a expressão da quinase ERK total e fosforilada (ERK 1/2) por *imunoblot*, utilizando *pools* de baço por grupo (n=3 animais). Os tratamentos com rGal-1 e Dex aumentaram a expressão da ERK ativada (p-ERK1/2) quando comparados com o grupo DA não tratado (Figura 8E).

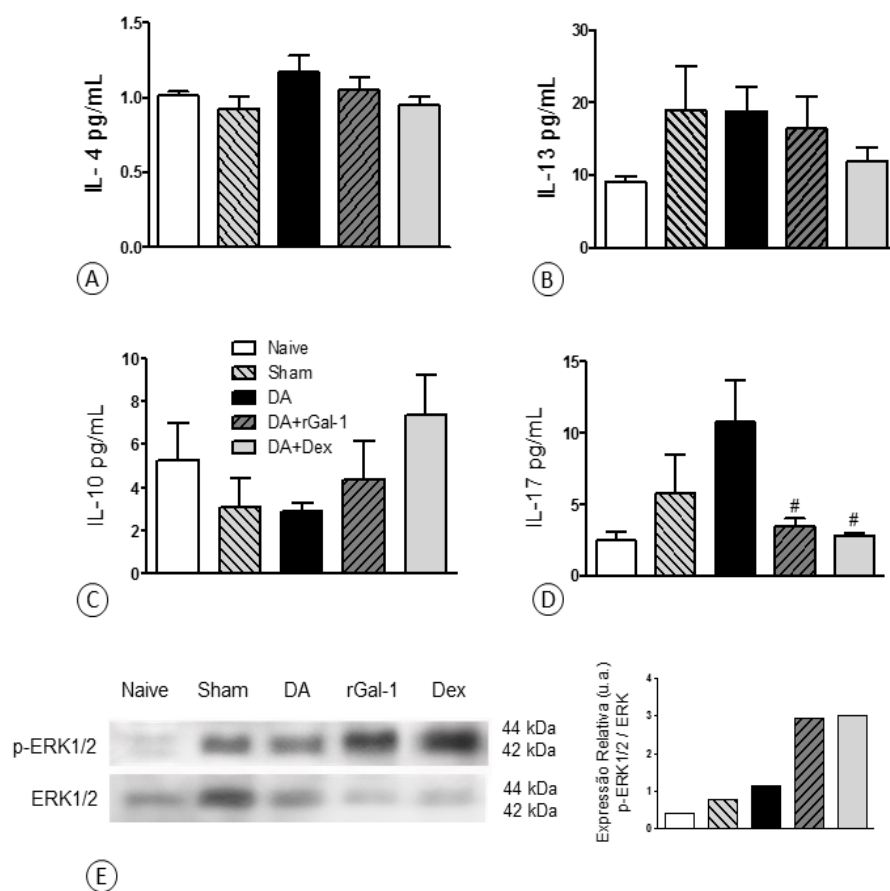


Figura 8 - Efeito da rGal-1 na resposta imune sistêmica no modelo de DA. A-D: Dosagem de citocinas plasmáticas: IL-4, IL-13, IL-10 e IL-17. Os dados representam as médias \pm S.E.M. de citocinas (pg/ MI) (n=6 animais/grupo). [#]P<0,05 vs DA (Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn). E: Expressão da quinase fosforilada p-ERK1/2 e total nos pools de baço (n=3 animais/grupo). rGal-1 e Dex induziram intensa imunorreatividade da p-ERK1/2 em relação ao grupo DA (imunoblots representativos de 2 experimentos realizados). Os dados são demonstrados como unidades arbitrárias (u.a.) da expressão relativa de p-ERK/ERK total.

4.3 Efeito da rGal-1 na resposta inflamatória da pele

Para a avaliação da resposta inflamatória associada ao modelo de DA, analisamos histologicamente as peles dos animais nas diferentes condições experimentais.

A pele dos animais controles, Naive e Sham, apresentaram aspecto normal com epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e derme constituída por tecido conjuntivo propriamente dito e presença de células residentes típicas, tais como fibroblastos e mastócitos (Figuras 9A,E). Além disso, também observamos os anexos

da pele nesses animais, as glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos (Figura 9A). No entanto, os animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram resposta inflamatória caracterizada por intenso influxo de células inflamatórias na derme, especialmente eosinófilos (Figuras 9B) e mastócitos desgranulados (Figura 9F). Os tratamentos com rGal-1 e Dex produziram menor influxo de eosinófilos e mastócitos na derme (Figuras 9C, D, G, H) comparados ao grupo DA não tratado.

A quantificação dessas células confirmou as observações histológicas. O modelo experimental de DA causou aumento significativo de eosinófilos (Figura 9I) e mastócitos (Figura 9J), comparado aos controles Naive e Sham. Por outro lado, a administração de rGal-1 e Dex produziu diminuição significativa de eosinófilos (Figura 9I).

Similarmente, as análises dos macerados de pele nesses dois grupos tratados demonstraram menor intensidade na expressão de Integrina α M, dos mediadores de mastócitos (mMCP6) e eosinófilos (EPX) na pele, em relação ao grupo DA não tratado (Figura 10D). Além disso, rGal-1 e Dex reduziram os níveis de eotaxina, RANTES e IFN- γ , sendo significantes apenas para o tratamento com Dex (Figura 10A-C). Essas alterações provocadas pelos tratamentos farmacológicos foram associadas ao aumento significativo da expressão de ERK1/2 fosforilada (Figura 10E).

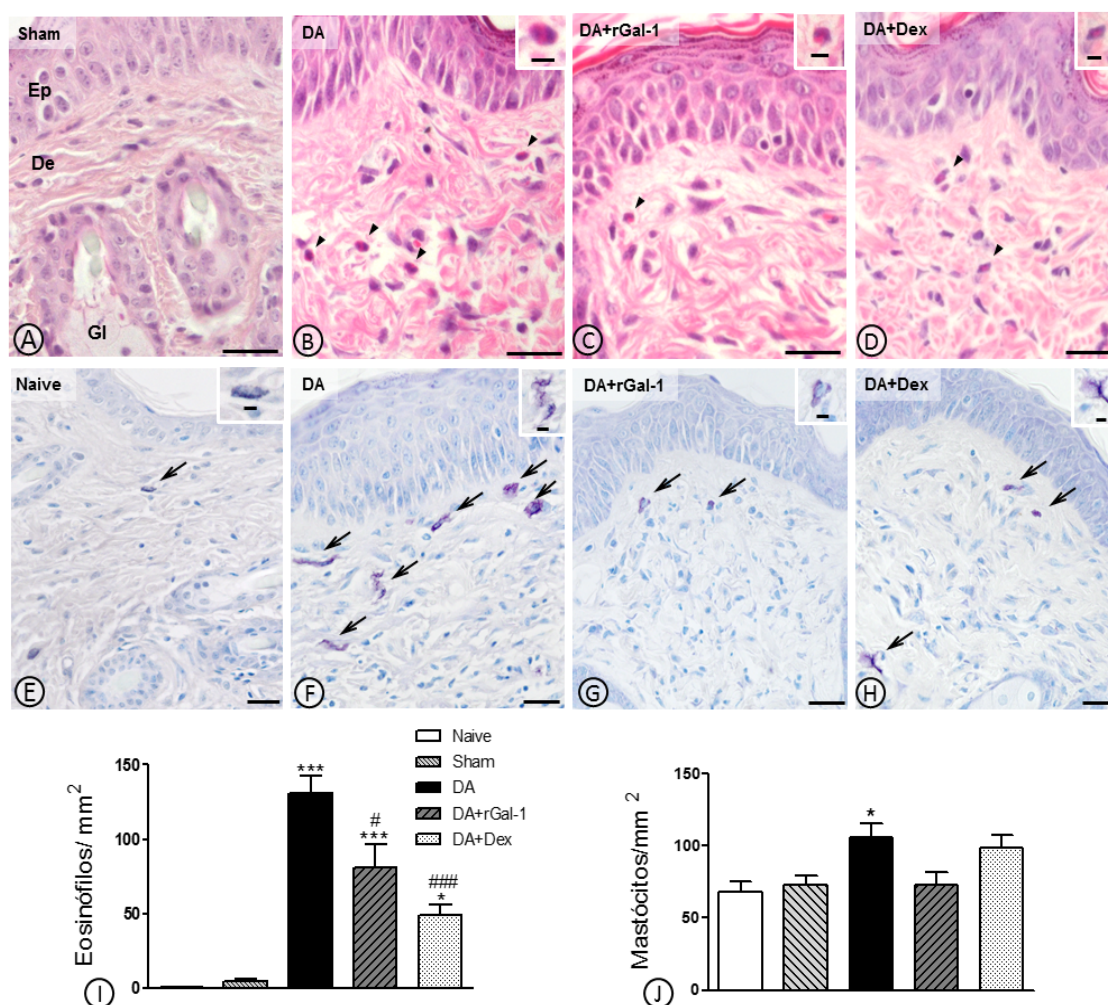


Figura 9 - Histopatologia da pele. A,E: Pele controle (Sham e Naive). Epiderme (Ep). Derme (De). Glândula sebácea (Gl). Fig. F com detalhe do mastócito íntegro com grânulos citoplasmáticos metacromáticos. B,F: Dermatite atópica (DA) caracterizada por intenso influxo de eosinófilos (cabeças de seta) e mastócitos (setas) na derme. Os tratamentos farmacológicos com rGal-1 [C,G] e Dex [D,H] mostram menor influxo de eosinófilos e mastócitos. Nos cantos superiores direitos das figuras B-D e F-H, detalhe de eosinófilos e mastócitos, respectivamente. Coloração: Hematoxilina e eosina [A-D] e azul de toluidina [E-H]. Barras: 50 μ m [A-H] e 10 μ m (insets). I: Quantificação de eosinófilos na pele. J: Número total de mastócitos na pele. Os dados representam as médias \pm S.E.M. do número de células por mm² (n = 6 animais/grupo). *P<0,05, ***P<0,001 vs grupos controles (naive e sham), ###P<0,001 vs DA (ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

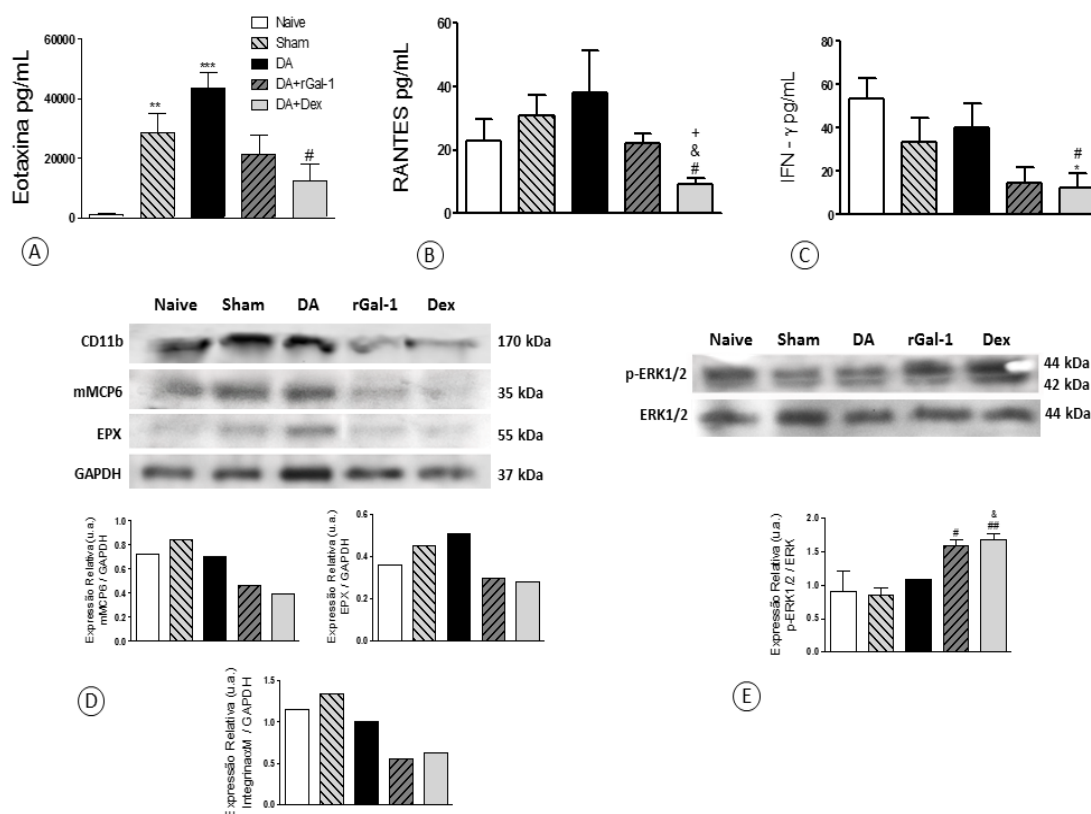


Figura 10 - Efeito da rGal-1 na resposta imune local no modelo de DA. A-C: Dosagem de eotaxina, RANTES e IFN- γ . Os dados representam as médias \pm S.E.M. de citocinas (pg) por mL (n=6 animais/grupo). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs naive; &P<0,05 vs sham, #P<0,05 vs DA; +P<0,05 vs rGal-1. D, E: Expressão da Integrina α M, protease 6 de mastócito (mMCP6), peroxidase eosinofílica (EPX), p-ERK1/2 e ERK1/2. rGal-1 e Dex provocaram fraca imunorreatividade de CD11b, mMCP6 e EPX nas peles em relação ao grupo DA, enquanto para p-ERK induziram intensa imunorreatividade (imunoblots representativos de 2-4 experimentos realizados). GAPDH utilizado como controle endógeno. Os dados são demonstrados como unidades arbitrárias (u.a.) da expressão relativa de CD11b, mMCP6 ou EXP/GAPDH e p-ERK/ERK. &P<0,05 vs sham, #P<0,05, ##P<0,01(Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn).

4.4 A DA induz aumento da expressão da proteína Gal-1, efeito revertido pelos tratamentos farmacológicos

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas a fim de definir a localização da expressão da proteína Gal-1 na pele em animais controles (Naive e Sham), submetidos a DA por OVA sem tratamento, ou tratados com rGal-1 ou Dex. Para a imunolocalização dessa proteína utilizamos o anticorpo policlonal *rabbit* anti-Gal-1.

A expressão da Gal-1 foi detectada na epiderme e na derme em todas as condições experimentais, corroborando estudos prévios (Akimoto *et al.*, 1995; Klíma *et al.*, 2009) e evidenciando o epitélio como fonte potencial dessa lectina. Os grupos controles, Naive e Sham, e DA (Figuras 11A-C) mostraram intensa imunorreatividade para Gal-1 na epiderme (epitélio) em comparação aos grupos tratados com rGal-1 e Dex (Figuras 11D-E). Na derme, a expressão de Gal-1 foi detectada na matriz extracelular com padrão semelhante de forte imunomarcacão para os grupos Sham, e DA (Figuras 11B-C) em relação aos grupos Naive e DA tratado com Dex (Figuras 11A e E). Nenhuma imunomarcacão foi detectada nas amostras utilizadas como controle da reacão (Figura 11F).

A análise densitométrica confirmou as observações histológicas, mostrando a diminuição significativa na expressão de Gal-1 endógena na epiderme após tratamentos farmacológicos com rGal-1 e Dex comparada aos grupos controles e DA (Figura 11G). Na derme, a DA foi associada com aumento significativo na expressão de Gal-1, comparada ao Naive, efeito revertido apenas pelo tratamento com Dex (Figura 11H). Similarmente, detectamos por imunoensaio nos macerados de pele que o tratamento com Dex reduziu os níveis de Gal-1 comparado a DA (Figura 11I).

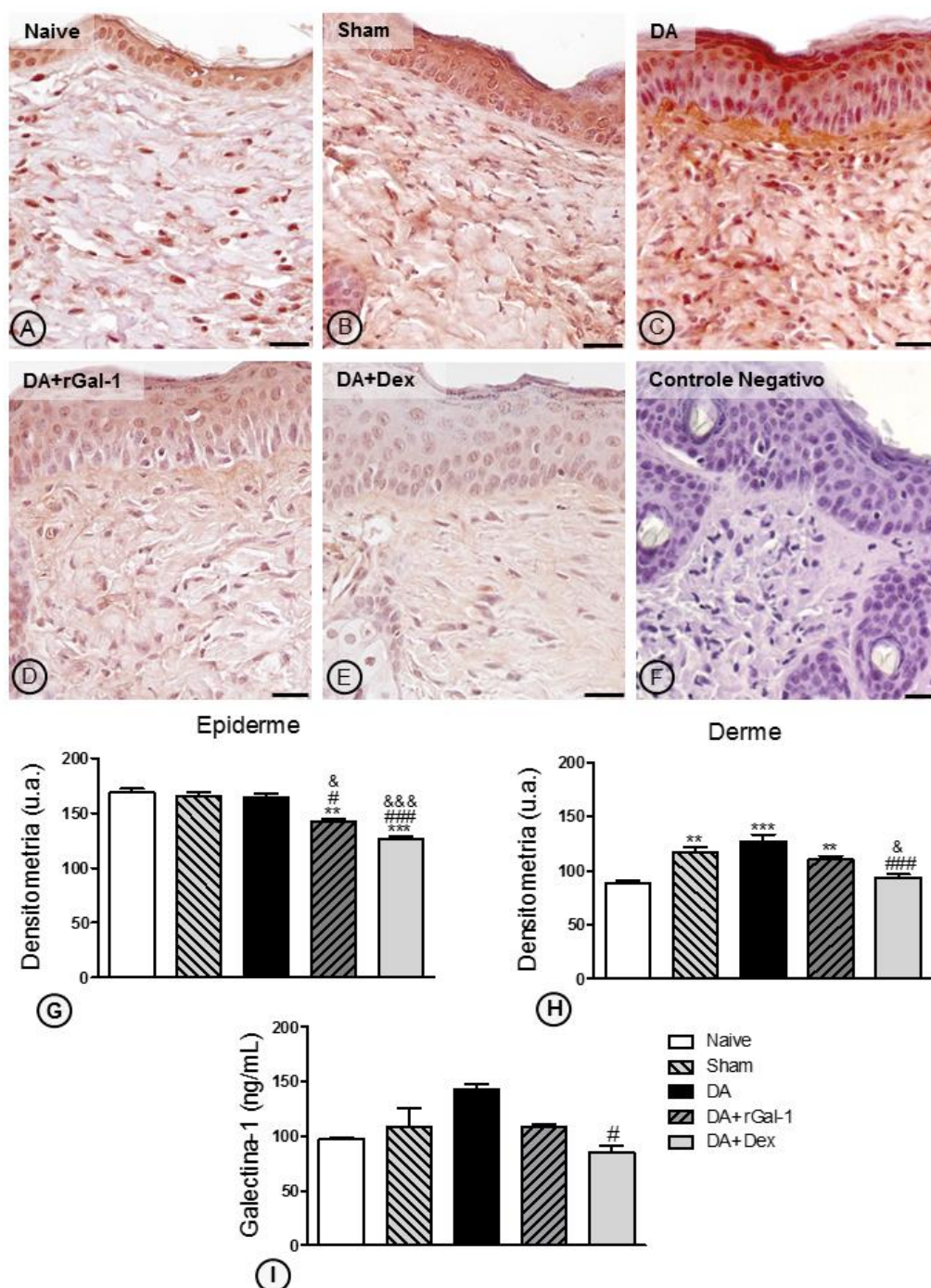


Figura 4 - Expressão da proteína Gal-1 na pele. A, B: Peles controles. C: Dermatite atópica (DA). D: DA tratada com rGal-1 (3µg). E: DA tratada com Dex. Intensa imunorreatividade para Gal-1 na epiderme (Ep) e derme (De) detectada nos grupos controles (Naive e Sham) e DA em relação aos grupos tratados com rGal-1 e Dex. F: Ausência de imunorreatividade para Gal-1 no controle negativo da reação. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 50µm. G,H: Análise densitométrica da expressão de Gal-1 na epiderme e derme. I: Imunoensaio para detecção de Gal-1 na pele. Dados representam as médias \pm S.E.M. da expressão de Gal-1 em unidades arbitrárias (u.a.) [G,H] ou ng/mL [I] (n=6 animais/grupo). **P<0,01, ***P<0,001 vs naive; &P<0,05, &&P<0,01, &&&P<0,001 vs sham; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs DA (Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o efeito do tratamento farmacológico com a Gal-1 recombinante (rGal-1) em modelo de dermatite atópica (DA) em camundongos induzida pela ovalbumina (OVA). Por meio de análises macroscópicas, histológicas, bioquímicas e moleculares, evidenciamos que o tratamento intraperitoneal com rGal-1 foi tão eficiente quanto a dexametasona (Dex) no controle da resposta inflamatória alérgica.

Inicialmente confirmamos a eficácia do nosso modelo experimental detectando aumento significativo dos níveis de IgE anti-OVA no plasma dos animais sensibilizados e desafiados pela OVA, independente de tratamentos farmacológicos, comparados aos grupos controles (Naive e Sham). Além disso, a DA experimental foi caracterizada por sinais de vermelhidão, lesões e aumento da espessura da pele em relação aos animais controles. As análises histológicas revelaram na derme intensa eosinofilia e elevado número de mastócitos, assim como altos níveis de seus mediadores EPX e mMCP6, respectivamente, características marcantes de uma resposta de hipersensibilidade do tipo I. Nossas observações macroscópicas e histopatológicas estão de acordo com estudos prévios experimentais de DA induzidos por OVA (KIM et al., 2012), ácaro (MATSUOKA et al., 2003), dinitrofluorobenzeno (LI et al., 2013), dinitroclorobenzeno (KIM et al., 2014) e oxazolone (HEO et al., 2015), modelos que mimetizam reações de hipersensibilidades tipo I e IV.

O efeito da administração intraperitoneal de rGal-1 diminuiu os sinais clínicos e espessura da pele, semelhantemente ao dexametasona (Dex). Estudos do nosso grupo de pesquisa também evidenciaram o papel da rGal-1 na diminuição dos sinais clínicos da conjuntivite alérgica induzida por OVA em camundongos, efeito associado com diminuição significativa dos níveis de IL-4 e IL-13 após 4 horas do último desafio (MELLO et al., 2015). Achados similares foram detectados em modelo de edema de pata induzida em ratos pela fosfolipase A2 de abelha no qual o pré-tratamento farmacológico com rGal-1 reduziu os sinais clínicos e o número de mastócitos no tecido após 4 horas (RABINOVICH et al., 2000).

A administração sistêmica de rGal-1 em nosso modelo de DA também reduziu significativamente os níveis plasmáticos de IL-17, assim como Dex, em comparação ao grupo DA sem tratamento. Pacientes com DA apresentam níveis elevados de IL-

17 no sangue em comparação com pacientes sem a doença, constituindo essa citocina um biomarcador importante para essa patologia (MA et al., 2014, LEONARDI et al., 2015). Em modelo animal, esplenócitos isolados de camundongos Balb/c com DA induzida por OVA aumentaram significativamente a produção de IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-17 após 72 horas de estímulo pela OVA *in vitro*, enquanto células sem estímulo não apresentam diferenças em comparação às retiradas de animais controles (SHERSHAKOVA et al., 2015). Além disso, em modelo de DA induzida por oxazolona animais nocautes para IL-17 apresentaram redução do edema de pele, eosinofilia e produção de IL-4 e IL-13 na pele e linfonodos em relação aos animais selvagens (NAKAJIMA et al., 2014, HEO et al., 2015). Ainda, a falta de IL-17 amenizou a disfunção da barreira epitelial evidenciada pela diminuição da perda transepidermal de água (HEO et al., 2015). Esses resultados mostram que o gene da IL-17 desempenha um papel na modulação da desregulação imune e na barreira cutânea em modelos murinos de DA.

Nesse cenário, é importante ressaltar que a Gal-1 é capaz de alterar o perfil de linfócitos T auxiliares (Th) extraídos de pele humana como demonstrado em estudos *in vitro* (CEDENO-LAURENT et al., 2010). Após incubação das células com Gal-1 por 24h, e estímulo com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)/ionomicina e brefeldina A, ocorreu aumento da população de linfócitos IL-4⁺ e IL-10⁺, e diminuiu IL-17⁺. Reforçando esse aspecto regulatório da Gal-1, outro trabalho mostrou que linfócitos T isolados de camundongos nocautes para Gal-1 com artrite induzida por colágeno II de galinha (CII), aumentaram significativamente a produção de IL-17 e IL-22, após 48 horas de estímulo *in vitro* com CII e comparado às células de animais selvagens (IQBAL et al., 2013). Em conjunto, os dados evidenciam o importante papel da Gal-1 na produção de IL-17 e, conseqüentemente, na regulação da DA.

Além de regular Th17, a Gal-1 é capaz de regular a produção de IFN- γ (Th1), como demonstrado em estudos prévios com essa lectina em modelos experimentais de artrite (RABINOVICH et al., 1999), colite (SANTUCCI et al., 2003), e uveíte (TOSCANO et al., 2006). *In vitro*, a co-cultura de linfócitos T do sangue periférico e células dendríticas da pele de pacientes com psoríase resultou na redução da produção de IFN- γ após adição da rGal-1, efeito revertido quando adicionado lactose (de la FUENTE et al., 2012). Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram que o IFN- γ é capaz de ativar os mastócitos, previamente sensibilizados com anticorpos IgE,

induzindo a liberação de histamina, IL-6 e IL-13 após 1 ou 24 horas do desafio com antígenos específicos (YU et al., 2011). Reforçando esse aspecto, em nosso modelo de DA, a pele dos animais tratados com rGal-1 mostrou níveis reduzidos de IFN- γ e da protease 6 (mMCP6) de mastócitos em relação ao grupo DA sem tratamento. Esses resultados sugerem que a ação exógena da Gal-1 é essencial para regular a ativação dos mastócitos e o desencadeamento dos sinais clínicos da DA.

Outro efeito local importante da rGal-1 na DA foi a redução da migração de eosinófilos, corroborada pela expressão reduzida de EPX, molécula de adesão CD11b e quimiocinas eotaxina e RANTES. Resultados similares foram mostrados em estudos usando modelo de conjuntivite alérgica induzida por OVA em camundongos, onde o pré-tratamento sistêmico com rGal-1 reduziu os níveis de eotaxina e RANTES nos linfonodos após 24 horas do último desafio com OVA e em comparação com o grupo não tratado (MELLO et al., 2015). Além disso, camundongos nocautes para Gal-1 apresentam inflamação exacerbada em modelo de asma induzido pela OVA, demonstrada pelo maior influxo de eosinófilos e linfócitos no fluido broncoalveolar e no pulmão, e maior resistência respiratória em comparação aos animais selvagens (GE et al., 2016). No mesmo estudo, *in vitro*, a administração de rGal-1 causou efeitos divergentes de forma dose dependente. Em baixas concentrações ($\leq 0.25 \mu\text{M}$) reduziu a migração dos eosinófilos induzida pela eotaxina e inibiu a ativação da ERK1/2. Em maior concentração ($\geq 1 \mu\text{M}$), induziu ativação da ERK1/2 nos eosinófilos, resultando no processo de apoptose e diminuição da expressão das moléculas de adesão CD49d e CCR3. No modelo de DA, também evidenciamos a ativação da ERK1/2 sistêmica (baço) e local (pele) após tratamento com rGal-1, ressaltando essa MAPK como via de ação anti-alérgica da Gal-1 na DA.

Finalmente, analisamos a expressão da proteína Gal-1 na pele em condições fisiológicas normais (grupo controle), submetida à DA sem tratamento, ou tratada com Dex ou rGal-1. Ambos tratamentos induziram diminuição significativa na expressão endógena de Gal-1 na epiderme comparada aos grupos controles e DA. Na derme, a DA foi associada com aumento significativo na expressão de Gal-1, comparada ao Naive, efeito revertido pelos tratamentos farmacológicos, de forma significativa apenas pelo Dex. Assim, em nosso modelo, níveis elevados de Gal-1 na derme estão associados a intenso influxo de eosinófilos. Corroborando esse aspecto, outras investigações demonstraram que a exposição ao alérgeno OVA resultou no aumento

de expressão da Gal-1 endógena em pulmões, olhos e conjuntiva, assim como no recrutamento de células inflamatórias positivas para Gal-1, incluindo os eosinófilos (MELLO et al., 2015; GE et al., 2016).

De fato, a expressão da Gal-1 tem sido demonstrada no núcleo, citoplasma e membrana das células, assim como na matriz extracelular dos tecidos, apesar de não possuir uma sequência sinal de secreção (LA et al., 2003; GIL et al., 2006; MELLO et al., 2015). No meio extracelular, a Gal-1 contribui para a adesão celular como revelado por ensaios *in vitro* de migração celular. Nesses estudos foi observado 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). 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.

6. CONCLUSÕES

1. O modelo experimental de DA induzida por OVA nos camundongos Balb/c causa de maneira eficaz a manifestação dos sinais clínicos da doença (vermelhidão, descamação, feridas) e aumento dos níveis plasmáticos de IgE anti-OVA comparados com os controles.
2. Os tratamentos farmacológicos com rGal-1 e Dex são eficazes na diminuição dos sinais clínicos na pele induzido pelo modelo de DA quando comparados aos animais sem tratamento.
3. No grupo DA, as análises histológicas e quantitativas das células inflamatórias demonstram aumento significativo de eosinófilos e mastócitos.
4. Os tratamentos com rGal-1 e Dex reduzem a migração de eosinófilos na derme comparado com os animais DA sem tratamento.
5. rGal-1 e Dex reduzem a expressão de mMCP6, EPX e de CD11b nos macerados de pele em comparação ao grupo DA não tratado.
6. Ambos os tratamentos farmacológicos reduzem os níveis de IL-17, eotaxina e RANTES.
7. A expressão da ERK fosforilada aumenta nos macerados da pele e baço após tratamento com rGal-1 e Dex em comparação ao grupo DA não tratado.
8. A DA induz aumento significativo na expressão da Gal-1 endógena na derme em relação aos controles.
9. Os tratamentos com rGal-1 e Dex reduzem os níveis endógenos de Gal-1 na epiderme, enquanto na derme somente Dex produz esse efeito em relação ao grupo DA sem tratamento.

Em conclusão, os efeitos imunomodulatórios da Gal-1 na resposta alérgica induzida pela OVA em camundongos revelam seu potencial uso terapêutico no tratamento de alergias, especialmente dermatite atópica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015

ABLAMOWICZ, A. F.; NICHOLS, J. J. Ocular Surface Membrane-Associated Mucins. **Ocul Surf**, v. 14, n. 3, p. 331-41, Jul. 2016.

ACCIANI, T. H. *et al.* Epidermal growth factor receptor signalling regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by airway epithelial cells and established allergic airway disease. **Clin Exp Allergy**, v. 46, n. 2, p. 317-28, Feb. 2016.

AKIMOTO, Y. *et al.* Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. **Cell Tissue Res**, v. 280, n. 1, p. 1-10, Apr. 1995.

BLASER, C. *et al.* Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 8, p. 2311-9, Aug. 1998.

BOLOGNIA, J.; JORIZZO, J. L.; SCHAFFER, J. V. **Dermatology**. 3rd. Philadelphia: Elsevier Saunders, 8186 pg. 2012.

CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. **Células, uma abordagem multidisciplinar**. 1ª edição Tamboré: Editora Manole, 2005.

CEDENO-LAURENT, F. *et al.* Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation. **J Immunol**, v. 185, n. 8, p. 4659-72, Out. 2010.

COMPAGNO, D. *et al.* Galectins: major signaling modulators inside and outside the cell. **Curr Mol Med**, v. 14, n. 5, p. 630-51, 2014.

COOPER, D.; NORLING, L. V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 6, p. 1459-66, Jun. 2008.

CRUSE, G.; BRADDING, P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. **Eur J Pharmacol**, v. 778, p. 125-38, May. 2016.

DARSOW U, RAAP U, STÄNDER S. Atopic Dermatitis. *In*: Carstens E, Akiyama T Sourceltch (Orgs.). **Mechanisms and Treatment**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 3. Frontiers in Neuroscience, 2014.

DE LA FUENTE, H. *et al.* Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. **J Pathol**, v. 228, n. 2, p. 193-203, Oct. 2012.

DE OLIVEIRA, C. M. B. *et al.* Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, São Paulo, v. 61, n. 2, p.255-265, 2011.

DELACOUR, D.; KOCH, A.; JACOB, R. The role of galectins in protein trafficking. **Traffic**, v. 10, n. 10, p. 1405-13, Oct. 2009.

DELBROUCK, C. *et al.* Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. **Lab Invest**, v. 82, n. 2, p. 147-58, Feb. 2002.

DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. **Roitt - Fundamentos de Imunologia**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 552p. 2013.

DESHMANE, S. L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun. 2009.

DHINGRA, N.; GULATI, N.; GUTTMAN-YASSKY, E. Mechanisms of contact sensitization offer insights into the role of barrier defects vs. intrinsic immune abnormalities as drivers of atopic dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 10, p. 2311-4, Oct. 2013.

FOSTER, E. L. *et al.* Eosinophils increase neuron branching in human and murine skin and in vitro. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22029, 2011.

GE, X. N.; *et al.* Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 33, p. E4837-46, Aug. 2016.

GIL, C. D. *et al.* Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflamm Res**, v. 55, n. 3, p. 99-107, Mar. 2006.

GIL, C. D.; GULLO, C. E.; OLIANI, S. M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 1, p. 74-84, 2010.

GIL, C. D. *et al.* Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 4, p. 338-44, Apr. 2006.

HEO, W. I. *et al.* The role of interleukin-17 in mouse models of atopic dermatitis and contact dermatitis. **Clin Exp Dermatol**, v. 40, n. 6, p. 665-71, Aug. 2015.

HUGHES, R. C. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. **Biochem Soc Trans**, v. 25, n. 4, p. 1194-8, Nov. 1997.

IQBAL, A. J. *et al.* Endogenous galectin-1 exerts tonic inhibition on experimental arthritis. **J Immunol**, v. 191, n. 1, p. 171-7, Oct. 2013.

IRKEC, M. T.; BOZKURT, B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 12, n. 5, p. 534-9, Oct. 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U. A.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto & atlas**. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.

KIM, H. *et al.* 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone attenuates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104938, 2014.

KIM, H. J. *et al.* A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of *Lactobacillus rhamnosus*. **Exp Dermatol**, v. 21, n. 9, p. 672-5, Sep. 2012.

KLÍMA, J. *et al.* Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. **Physiol Res**, v. 58, n. 6, p. 873-84, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2008.

LA, M. *et al.* A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **Am J Pathol**, v. 163, n. 4, p. 1505-15, Oct. 2003.

LEFFLER, H. *et al.* Introduction to galectins. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p. 433-40, 2004.

LEONARDI, S. *et al.* Serum interleukin 17, interleukin 23, and interleukin 10 values in children with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS): association with clinical severity and phenotype. **Allergy Asthma Proc**, v. 36, n. 1, p. 74-81, Feb. 2015.

LEUNG, D. Y.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151-60, Jan. 2003.

LEUNG, D. Y.; GUTTMAN-YASSKY, E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 4, p. 769-79, Oct. 2014.

LI, Y. Z. *et al.* Anti-inflammatory effect of qingpeng ointment in atopic dermatitis-like murine model. **Evid-Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 907016, 2013.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, Jan. 2005.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1183, p. 158-82, Jan. 2010.

LUGER, T. *et al.* Pimecrolimus in atopic dermatitis: consensus on safety and the need to allow use in infants. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 26, n. 4, p. 306-15, Jun. 2015.

MA, L. *et al.* The Imbalance of Th17 cells and CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) Treg cells in patients with atopic dermatitis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 28, n. 8, p. 1079-86, Aug. 2014.

MASHIKO, S. *et al.* Human mast cells are major IL-22 producers in patients with psoriasis and atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 136, n. 2, p. 351-9.e1, Aug. 2015.

MATSUOKA, H. *et al.* A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. **Allergy**, v. 58, n. 2, p. 139-45, Feb. 2003.

MELLO, C. B. *et al.* Immunomodulatory effects of galectin-1 on an IgE-mediated allergic conjunctivitis model. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 56, n. 2, p. 693-704, Feb. 2015.

MODENA, B. D.; DAZY, K.; WHITE, A. A. Emerging concepts: mast cell involvement in allergic diseases. **Transl Res**, v. 174, p. 98-121, Aug. 2016.

NAKAJIMA, S. *et al.* IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 8, p. 2122-30, Aug. 2014.

NORLING, L. V. *et al.* Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. **FASEB J**, v. 22, n. 3, p. 682-90, Mar. 2008.

OFFIAH, I.; CALDER, V. L. Immune mechanisms in allergic eye diseases: what is new? **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 9, n. 5, p. 477-81, Oct. 2009.

PELAIA, G. *et al.* Mitogen-activated protein kinases and asthma. **J Cell Physiol**, v. 202, n. 3, p. 642-53, Mar. 2005.

PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, n. 6, p. 402-12, May 1998.

RAAP, U.; KAPP, A. Neurotrophins in healthy and diseased skin. **Giornale Italiano di Dermatologia Venereologia**, v. 145, n. 2, p. 205-11, 2010.

RABINOVICH, G. A. *et al.* Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. **J Exp Med**, v. 190, n. 3, p. 385-98, Aug. 1999.

RABINOVICH, G. A. *et al.* Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. **J Immunol**, v. 160, n. 10, p. 4831-40, May. 1998.

RABINOVICH, G. A. *et al.* The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. **Cancer Immunol Immunother**, v. 50, n. 11, p. 597-603, Jan. 2002.

RABINOVICH, G. A. *et al.* Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 5, p. 1331-9, May 2000.

RAFACHO, A. *et al.* Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 5, p. 536-45, May 2007

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia - texto e atlas**.7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SANTUCCI, L. *et al.* Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterol**, v. 124, n. 5, p. 1381-94, 2003.

SCHLAPBACH, C.; SIMON, D. Update on skin allergy. **Allergy**, v. 69, n. 12, p. 1571-81, 2014.

SHERSHAKOVA, N. *et al.* Allergen-Specific Immunotherapy with Monomeric Allergoid in a Mouse Model of Atopic Dermatitis. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135070, 2015.

TOSCANO, M. A. *et al.* Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **J Immunol**, v. 176, n. 10, p. 6323-32, May 2006.

VASTA, G. R. *et al.* Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. **Front Immunol**, v. 3, p. 199, 2012.

WATSON, W.; KAPUR, S. Atopic dermatitis, **Allergy Asthma Clin. Immunol.** 7 (Suppl. 1) (2011)

WERFEL, T. *et al.* Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 138, n. 2, p. 336-49, Aug. 2016.

WOA. **Atopic Eczema.** Disponível em: <
http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/atopiceczema/>.
Acessado em: 13 de jan. 2017.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Rev Mol Med**, v. 10, p. e17, Jun. 2008.

YU, M. *et al.* Identification of an IFN- γ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. **J Clin Invest**, v. 121, n. 8, p. 3133-43, Aug. 2011.

ZUÑIGA, E. *et al.* Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **J of Leukoc Biol**, v. 70, n. 1, p. 73-9, Jul. 2001.

8. APÊNDICES

Apêndice A – Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 06 de abril de 2015

CEUA N [1906060115](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Cristiane Damas Gil

Depto/Disc: Biologia Estrutural E Funcional

Pesquisadores associados: Mab Pereira Correa (IBILCE-UNESP); Cristiane Damas Gil (orientador)

Título do projeto: "ESTUDO DO PAPEL DA PROTEINA GALECTINA-1 EM MODELO EXPERIMENTAL DE DERMATITE ATÓPICA INDUZIDA POR OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A dermatite atópica (DA), também conhecida como eczema atópico, e a inflamação crônica mais comum da pele, de etiologia multifatorial, caracterizada pela produção de IgE e citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-13). Os tratamentos para DA incluem emolientes, glicocorticoides tópicos, inibidores de calcineurina, fototerapias, e imunossupressores tais como ciclosporina A, que são eficientes na redução da inflamação, mas causam efeitos adversos. Portanto, o desenvolvimento de novas terapias é necessário para o tratamento dessa patologia. Nesse cenário, destacamos a galectina-1 (Gal-1), proteína de 14,5 kDa que regula o processo de transmigração dos leucócitos, liberação de citocinas e desgranulação de mastócitos, contribuindo para a homeostase da reação inflamatória. Contudo, os mecanismos pelos quais a Gal-1 modula as respostas celulares nos processos inflamatórios alérgicos ainda não estão completamente determinados, especialmente na pele. Desse modo, analisaremos o efeito do tratamento farmacológico com a proteína recombinante Gal-1 (rGal-1) na imunomodulação da DA em modelo experimental murino. Camundongos Balb/c machos serão sensibilizados com ovalbumina de galinha (OVA; 100 µg) diluída em 100 µl de salina em uma gaze esteril de 1x1 cm que será aderida ao dorso do animal sem pelos com um filme transparente de poliuretano esteril (3M™ Tegaderm™ Filmes Transparentes, Brasil). Os animais controles receberão gaze somente com salina esteril. Cada animal terá um total de 3 exposições de 1 semana ao antígeno com intervalo de 14 dias entre cada aplicação. Parte dos camundongos sensibilizados serão tratados intraperitonealmente com a proteína rGal-1 (0,3 µg/ animal) ou somente com salina esteril na última semana do protocolo experimental por 7 dias (1 vez ao dia). Após 24 horas do último período de exposição a OVA ou salina (controle), 50º dia, os animais serão anestesiados para coleta de sangue e, posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical para coleta da pele. Os estudos serão realizados por meio de: escore clínico, análises histológicas e quantitativas de mastócitos, eosinófilos e linfócitos T CD4 na pele; dosagens de IgE anti-ovalbumina e citocinas no sangue e lisado de pele, e; imunohistoquímica e western blotting para detectar a expressão da Gal-1 e quinases da via MAPK na pele. Os resultados contribuirão para o melhor

entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que envolvem as ações biológicas da Gal-1 na alergia, assim como possíveis alvos terapêuticos para os processos inflamatórios da pele.

Animais:

Serão utilizados:

- 24 Camundongos Balb/c, machos, idade: 6-8 semanas

Procedência: CEDEME

Manutenção: Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural

Vigência do Estudo:

Início previsto: 02/2015 e término previsto: 12/2016

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 06/04/2015, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Apêndice B – Manuscrito

Anti-Inflammatory Effect of Galectin-1 in a Murine Model of Allergic Dermatitis

Mab Pereira Corrêa¹, Frans Eberth Costa Andrade², Alexandre Dantas Gimenes² and Cristiane Damas Gil^{1,2}

¹UNESP – São Paulo State University, from the Post-Graduation in Biosciences, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 15054-000, São José do Rio Preto, Brazil;

²UNIFESP – Federal University of São Paulo, Department of Morphology and Genetics, 04023-900, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Cristiane Damas Gil. Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, Ed. Lemos Torres – 3º andar, 04023-900 São Paulo, São Paulo, Brazil, Telephone: +55 11 5576-4268, E-mail: cristiane.gil@unifesp.br

Abstract

Atopic dermatitis (AD) is caused by both dysregulated immune responses and an impaired skin barrier. Although beta-galactoside binding protein galectin-1 (Gal-1) has immunomodulatory effects in several inflammatory disorders, therapeutic strategies based on its anti-inflammatory properties have not been explored in AD. Thus, we evaluate pharmacological treatment with Gal-1 in the progression of an ovalbumin (OVA)-induced AD-like skin lesions. The skin of OVA-immunised male BALB/c mice was challenged with drops containing OVA on days 11, 14-18 and 21-24. Additionally, in the last week a subset of animals was treated intraperitoneally with recombinant Gal-1 (rGal-1) or dexamethasone (Dex). Treatment with rGal-1 decreased the clinical signs of dermatitis in BALB/c mice and diminished local eotaxin and IFN- γ levels. The treatment also suppressed the infiltration of eosinophils and mast cells, which was verified by reduced expression of mouse mast cell protease 6 (mMCP6) and eosinophil peroxidase (EPX). These localized effects are associated with extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation and downregulation of endogenous Gal-1. The inhibition of disease progression induced by rGal-1 was also correlated with reduced plasma IL-17 levels, as well as upregulation of phosphorylated ERK on splenic cells. Our results demonstrate that rGal-1 is an effective treatment for allergic skin inflammation in AD and may impact the development of novel strategies for skin inflammatory diseases.

Key words: galectin-1, skin inflammation, ovalbumin, eosinophil, mast cell, ERK.

Introduction

Atopic dermatitis (AD), also known atopic eczema, represents the most common chronic inflammatory skin disease, characterized by itchy, red, swollen and cracked skin [1, 2]. AD etiology is multifactorial and there is evidence that genetic predisposition and family history for atopic diseases, such as bronchitis, asthma and rhinitis, influence AD development.

The pathogenesis of AD is attributed to an imbalance in the adaptive immune system, including dysfunction in T helper (Th) cells and increased IgE production [1-3]. Cytokines and chemokines, such as interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, eotaxins, C-C motif chemokine ligand (CCL) 17, CCL18 and CCL22, produced by Th2 cells and dendritic cells stimulate the infiltration of mast cells and eosinophils into the skin. Th2 and Th17 lymphocytes predominate in patients with AD, but Th1 cells also contributes to the pathogenesis. Cytokines produced by Th2 and Th17 cells (IL-4/IL-13 and IL-17/IL-22, respectively) inhibit terminal differentiation of the epidermis and contribute to breakdown of the epithelial barrier in patients with AD.

There are a number of treatments for AD which include emollients, dexamethasone, topical glucocorticoids, calcineurin inhibitors, phototherapies and immunosuppressant such cyclosporine A, which are effective in reducing inflammation but cause adverse effects [1, 2]. Thus, the discovery of new pharmacological agents that have high efficacy in controlling the inflammatory response with fewer side effects is critical.

Galectin-1 (Gal-1) is a 14.5-kDa β -galactoside-binding mammalian lectin with anti-inflammatory properties demonstrated *in vitro* and *in vivo* experimental models. *In vitro*, incubation with recombinant Gal-1 (rGal-1) inhibits the migration of human neutrophils [4] and lymphocytes [5] through endothelial cells following IL-8 or TNF- α stimulation, respectively. *In vivo*, rGal-1 administration is associated with inhibition of neutrophil extravasation into the peritoneal cavity after 4 hours of carrageenan- [6], zymosan- [7] or IL-1 β -induced peritonitis in rodents [4]. The anti-migratory effect of Gal-1 is also associated with the modulation of L-selectin and β 2-integrin expression on the surface of leukocytes [5,7,8], but not E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 on endothelial cells [5]. In a mouse model of ovalbumin-induced allergic conjunctivitis, we have recently shown that rGal-1 inhibits IL-4, IL-13 and eotaxin levels in lymph nodes, is associated with reduced clinical signs of disease and decreased plasma IgE anti-ovalbumin levels [9]. However, the mechanisms by which Gal-1 modulates cellular responses in allergic inflammatory processes are not still completely determined, especially in the skin.

In addition to these immunomodulatory roles, the signal transduction events that lead to Gal-1 induced neutrophil and endothelial cell migration and T-cell death, include the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

[10-12]. MAPKs, a well-conserved signaling pathways, includes three subtypes: c-jun N-terminal kinases (JNK), extracellular signal-regulated kinases (ERK) and p38 proteins, which are crucial to induce the expression of multiple genes that together regulate the immune responses [13]. This kinase family have been implicated in allergic responses, particularly in asthma, contributing to leukocyte recruitment, mast cell activation, pro-inflammatory cytokine production and differentiation of Th2 and Th17 lymphocytes [14,15].

Given the known anti-inflammatory effects of Gal-1 and the current limitations in the treatment of AD, we evaluated the mechanism of action of this protein in an experimental model of ovalbumin-induced AD in mice.

Material and methods

Animals

Male BALB/c mice, weighing 20-25 g, were randomly distributed into 5 groups (n = 6 animals/group). The animals were housed in a 12-h light-dark cycle and were allowed food and water *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of São Paulo - UNIFESP (CEP 1906060115/2015).

Allergic Dermatitis Model and Treatment Protocols

BALB/c mice were immunized on days 0 and 7 with a subcutaneous injection of 5 µg of ovalbumin (OVA, grade V; Sigma-Aldrich, MO, EUA) and 10 mg/mL of aluminium hydroxide adjuvant diluted in 200 µl of sterile saline according to previous studies [9,16] with modifications. On day 11th, animals were shaved and the hair removed from the whole back. The skin of mice was challenged with drops containing 250 µg of OVA diluted in 50 µl of JOHNSON'S® baby oil on days 11, 14-18 and 21-24. In the last week (days 21-24), mice were pre-treated with recombinant Gal-1 protein (rGal-1; Peprtech EC Ltd, London, UK) 3 µg/animal, or dexamethasone (Dex) (1 mg/kg, Sigma-Aldrich) intraperitoneal, diluted in 0.1 ml of sterile saline 15 minutes prior OVA challenge. rGal-1 and Dex doses were scaled up from the anti-inflammatory doses described previously [6,9]. 24 hours after the last OVA challenge, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) followed by cardiac puncture using a syringe with 3.8% sodium citrate to obtain blood. Animals were then euthanized and the skin and spleen collected.

Analysis of IgE Anti-Ovalbumin and Gal-1 Levels

Blood from various experimental conditions was centrifuged at 600 x g for 10 minutes to collect the plasma and determine the IgE anti-OVA levels by ELISA. The concentration of IgE anti-OVA was measured using a commercially available mouse IgE anti-OVA immunoassay kit (Cayman Chemical Co., MI, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Gal-1 levels in skin homogenates were determined using a commercially available

kit (RayBiotech, GA, USA), in accordance with the manufacturer's guidelines. All experiments were conducted in duplicate and the data expressed as the mean \pm SEM protein (ng/mL).

Skin Thickness, Histopathology and Quantification of Inflammatory Cells

Skins were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, washed in tap water, dehydrated in a decreasing ethanol series, and embedded in paraffin. Sections of 3 μ m were obtained in a Leica RM2155 microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) and subsequently stained with haematoxylin-eosin or toluidine blue 0.5% for histopathology and inflammatory cell quantification. Eosinophils and mast cells were quantified using a 40x objective on an Axio Scope A1 Zeiss microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Three semi-serial sections of skin were analyzed per animal and the area was determined using AxioVision software (Carl Zeiss). Values are expressed as the mean \pm SEM cells per mm².

A 10x objective was used to measure skin thickness, with lines perpendicular to the keratin layer of epidermis up to the hypodermis. For each animal, three measurements of the epidermis + dermis were taken at random intervals using AxioVision software (Carl Zeiss). Values are shown as mean \pm SEM of the thickness (mm).

Immunohistochemistry

Endogenous Gal-1 staining was performed in 3 μ m sections of paraffin-embedded skin. 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 a rabbit polyclonal anti-Gal-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluted 1:200 in PBS 1% BSA. After washing, sections were incubated with a secondary biotinylated antibody (LAB-SA Detection kit, Invitrogen, Paisley, UK). Positive staining was detected using a peroxidase-conjugated streptavidin complex, and colour was developed using DAB substrate (Invitrogen). The sections were counterstained with haematoxylin.

Densitometry analysis of Gal-1 immunostaining was performed in the epidermis and dermis (n = 6 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 (Carl Zeiss, Jena, Germany). The data are expressed as the mean \pm SEM of a. u.

Western Blot Analysis

Skins and spleens were sonicated in a 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1% Triton-X, pH 7.4 buffer containing a complete protease inhibitor cocktail and PhosSTOP tablets (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Subsequently, samples were centrifuged at 10,000 x g for 20 minutes at 4°C to obtain organ supernatants. Protein levels were determined by Bradford assay and normalized prior to boiling in Laemmli buffer (Bio-Rad Laboratories, USA). Pooled protein extracts (30 μ g per lane) of skin or spleens (n = 3 animals per group) from indicated

experimental conditions were loaded onto a 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel for electrophoresis together with appropriate molecular weight markers (Bio-Rad Life Science, USA) and transferred to ECL Hybond nitrocellulose membranes. Reversible protein staining of the membranes with 0.1% Ponceau-S in 5% acetic acid (Santa Cruz Biotechnology) was used to verify protein transfer. Membranes were incubated for 15 minutes in 5% BSA in Tris-buffered saline (TBS) prior to incubation with antibodies. Primary antibodies used herein: rabbit polyclonal antibody anti-ERK1/2 (1:5000), mouse monoclonal anti-phosphorylated (p)-ERK $\frac{1}{2}$ (1:2000) (Cell Signaling, Danvers, EUA), goat polyclonal anti-mouse mast cell protease 6 (mMCP6; 1:5000) (R&D Systems, Minneapolis, EUA), anti-eosinophil peroxidase (EPX; 1:200) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-integrin α M (CD11b; 1:200) (Santa Cruz Biotechnology) and anti-GAPDH (1:5000) (Sigma-Aldrich), all diluted in TBS with 0.1% Tween 20. Post primary antibody incubation, membranes were washed for 15 minutes with TBS and subsequently incubated for 60 minutes at room temperature with the appropriate secondary antibodies. Secondary antibodies were peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, rabbit anti-goat (1:2000) (Thermo Fisher Scientific Inc., MI, USA) or goat anti-mouse (1:2000) (Millipore Corporation, CA USA). Finally, membranes were washed for 15 minutes with TBS, and immunoreactive proteins were detected (Westar Nova 2.0 chemiluminescent substrate kit; Cyanagen, Bologna, Italy) using a GeneGnome5 chemiluminescence detection system (SynGene, Cambridge, UK). Proteins were imaged and quantified using the software GeneTools (SynGene) to determine the relative expression of indicated proteins (arbitrary units, a.u.).

Analysis of Cytokines and Chemokines

Multiplex analysis was performed with 25 μ l of the skin supernatants and plasma using the MILLIPLEX MAP mouse cytokine/chemokine panel (MT17MAG47K-PX25; Millipore Corporation, USA) and MAGPIX® Multiplexing Instrument (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Seven analytes were measured: IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, interferon gamma (IFN- γ), eotaxin and RANTES (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and presumably secreted). The concentration of analytes was determined by MAGPIX Xponent software (Millipore Corporation, MA, USA), and the results are reported as the mean \pm SEM of analytes (pg/ml).

Statistical Analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software. Results were confirmed to follow a normal distribution using Kolmogorov-Smirnov test of normality with Dallal-Wilkinson-Lillie for corrected *P* value. Data that passed the normality assumption was analyzed using ANOVA with Bonferroni post hoc test. Data that failed the normality assumption were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunn post-test. Differences were considered statistically significant at a value of *P* < 0.05.

Results

Pharmacological Treatment with rGal-1 Reduces Clinical Signs of AD

Clinical assessment of AD and skin thickness measurements were performed by macroscopic analysis of mouse skins on the final day of the experimental protocol (day 24). The AD group exhibited skin with erythema, erosion, and dryness associated with a significant increase in skin thickness compared to the control groups (Naive and Sham) (Fig. 1a-c and f), demonstrating inflammation induced by the epicutaneous challenge with OVA. Intraperitoneal treatment with rGal-1 or Dex reduced this AD clinical response, leaving skins with a similar appearance to control animals (Fig. 1a-b, d-e). Furthermore, rGal-1 or Dex-treated animals displayed a diminished skin thickness in relation to the AD group (Fig. 1f).

rGal-1 Regulates Systemic Immune Responses and Activates the ERK Pathway

We first assessed the systemic immune response by measuring OVA-specific plasma IgE levels. Epicutaneous serial OVA administration significantly increased the plasma anti-OVA IgE concentration in all AD groups (AD: 231 ± 28 ; rGal-1: 257 ± 45 ; Dex: 205 ± 28 ng/ml) in relation to control groups ($P < 0.001$), supporting the efficacy of our experimental model.

Next, we analyzed chemokine and cytokine profiles to assess the systemic effect of rGal-1 and Dex treatments on AD. Both rGal-1 and DEX treatments markedly reduced plasma IL-17 levels compared to the AD group (Fig. 2g), while rGal-1 alone diminished the plasma eotaxin concentration (Fig. 2a). However, multiplex immunoassays revealed no significant difference in the plasma levels of RANTES, IL-4, IL-13, IL-10 or IFN- γ between the untreated AD and the Dex- and rGal-1-treated AD groups (Fig. 2b-f).

To understand the downstream systemic molecular signalling pathways involved regulated by rGal-1 treatment in AD, we analyzed the phosphorylation levels of ERK and MAPK by Western blot using pooled extracts of spleens ($n = 3$ animals per group). rGal-1 and Dex treatments increased p-ERK levels compared with the nontreated AD group (Fig. 2h), suggesting both treatments function via a similar mechanism.

Effect of rGal-1 on the Inflammatory Response of the Skin

Histopathological analysis of control skins revealed a normal morphology (Fig. 3a,e). In contrast, sensitized and OVA-challenged mice exhibited an inflammatory response characterized by significant infiltration of inflammatory cells in the dermis, particularly eosinophils (Fig. 3b) and degranulated mast cells (Fig. 3f). Treatment with rGal-1 and Dex resulted in fewer eosinophils and mast cells in the dermis compared to the untreated AD group (Fig. 3c, d, g, h).

Inflammatory cell counts confirmed the histological observations with significant increase of eosinophils (Fig. 3i) and mast cells (Fig. 3j) in AD group compared to the controls. Conversely, rGal-1 and Dex administration produced a significant decrease in eosinophil influx (Fig. 3i).

The presence of inflammatory cells in the mouse skins was confirmed by immunoblot analysis. rGal-1- and Dex-treated groups exhibited reduced levels of endogenous adhesion molecule CD11b, EPX and mMCP6 compared to AD group (Fig. 4d). Furthermore, diminished levels of eotaxin, RANTES and IFN- γ were detected in skin homogenates from both treated groups, but only Dex treatment caused a significant reduction compared to AD group (Fig. 4a-c). This pattern of regulation in the skin inflammatory response caused by both pharmacological treatments was also associated with a significant increase in phosphorylated ERK expression (Fig. 4e).

AD Induces Increased Expression of Gal-1 Protein

To further characterize the Gal-1 expression in mouse skin during the AD inflammatory response, we evaluated Gal-1 protein levels by immunohistochemistry and ELISA.

Gal-1 expression was detected in both the epidermis and dermis under all experimental conditions, consistent with previous studies [17,18] suggesting that the epithelium is a potential source of this lectin. 24 hours after the last epicutaneous OVA challenge, epidermis and dermis from the AD group displayed intense immunostaining for Gal-1 compared with the rGal-1- and Dex-treated AD groups (Fig. 5a-c). The histologic findings were supported by densitometry analyses of Gal-1 expression in the epidermis and dermis (Fig. 5e-f). Similarly, ELISA data from skin homogenates showed that rGal-1 and Dex-treated samples exhibited decreased endogenous Gal-1 levels compared to AD samples (Fig. 5g). No immunostaining was detected in the negative control section (Fig. 5d).

Discussion

In this study, we evaluated the effect of pharmacological treatment with recombinant Gal-1 (rGal-1) on OVA-induced AD model in mice. Using macroscopic, histological, biochemical and molecular analyzes, we showed that systemic rGal-1 treatment was as effective as dexamethasone (Dex), in the regulation of the allergic inflammatory response in skin.

The development of AD was confirmed through the detection of clinical signs such as erythema and dryness, increased skin thickness and plasma anti-OVA IgE levels compared to control animals. Histological analysis revealed eosinophilia and increased mast cell number in the dermis, which were confirmed by increased EPX and mMCP-6 protein levels in skin homogenates. These results suggest that external exposure to an allergen can induce localized allergic inflammation in the skin and a systemic sensitization to specific allergen as demonstrated

by previous AD models induced by OVA, house-dust mite, 2,4-dinitrofluorobenzene, 2,4-dinitrochlorobenzene and oxazolone [16, 19-22].

Intraperitoneal administration of rGal-1, as well as Dex, decreased the clinical signs and skin thickness associated with AD, but did not reduce IgE levels 24 hours after the last epicutaneous OVA challenge. Our group has previously shown that systemic rGal-1 treatment reduced the clinical signs of OVA-induced allergic conjunctivitis in mice, the effect was associated with a significant decrease in the IL-4 and IL-13 levels 4 hours after the final OVA challenge ([9]. Similar findings were detected in a phospholipase A2-induced oedema model in rat paw, in which pharmacological pretreatment with rGal-1 reduced clinical signs and mast cell numbers in the tissue at 4 hours [23].

Systemic administration of rGal-1 also markedly reduced plasma IL-17 levels compared to the untreated AD group, an important cytokine biomarker for AD patients [24,25]. In a previous mouse model, splenocytes isolated from OVA-induced AD BALB/c mice had significantly increased levels of IL-4, IL-5, IFN- γ and IL-17 after 72 hours of OVA stimulation *in vitro*, whereas unstimulated cells were not significantly different than control animals [26]. Furthermore, in oxazolone-induced AD IL-17-null mice exhibit reduction of skin edema, eosinophilia, IL-4 and IL-13 production in skin and lymph nodes relative to wild-type animals [22,27]. The lack of IL-17 expression also ameliorated the skin-barrier dysfunction as evidenced by decreased transepidermal water loss [22]. The results indicate that the IL-17 gene may play a role in modulating immune dysregulation and affecting skin barrier in AD mouse models.

It is important to note that Gal-1 plays an essential role in modulating adaptive immune responses by altering the phenotype of T cells. In this regard, human skin-resident T cell cultures incubated with a mouse Gal-1 human Ig chimera (Gal-1hFc), and stimulated with phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)/ionomycin and brefeldin A, increased IL-4⁺ and IL-10⁺ lymphocyte populations and decreased IL-17⁺ population [28]. Reinforcing this regulatory aspect of Gal-1 on Th cells, another study found that lymphocytes isolated from Gal-1-null mice with chicken collagen II (CII)-induced arthritis, significantly upregulated IL-17 and IL-22 production *in vitro* after 48 hours of CII stimulation when compared to wild-type cells [29]. Taken together, our data suggests that Gal-1 plays a functional role in the regulation of IL-17 production and consequently in the regulation of AD.

In addition to regulating Th17, Gal-1 was able to downregulate IFN- γ (Th1) production, as demonstrated in previous studies using experimental models of arthritis [30], colitis [31] and uveitis [32]. The addition of Gal-1 to human monocyte-derived dendritic cell-T cell cocultures from psoriasis patients has also been shown to reduce IFN- γ production. This could be reversed by the addition of lactose [33]. Furthermore, it was shown that IFN- γ /mast cell

axis is involved in the pathology of chronic allergic inflammation of the airways in mice [34]. In the study, IFN- γ significantly increased the release of histamine, IL-6, and IL-13 by IgE + specific antigen-stimulated bone marrow-derived cultured mast cells *in vitro*, after 1 or 24 hours of challenge, whereas treatment of the cells with IFN- γ alone had no effect. In support of this finding, in our AD model, diminished levels of IFN- γ were detected in the skin of rGal-1-treated mice. This reduction correlated with reduced levels of mMCP6 when compared to the untreated AD group, suggesting that the exogenous action of Gal-1 is essential to regulate the activation of mast cells and the initiation of clinical signs of AD.

Another important local effect of rGal-1 discovered in our AD model is the inhibitory role on eosinophil migration, which was validated by the downregulation of EPX, adhesion molecule CD11b, and chemokines eotaxin and RANTES. Similar findings were detected in a OVA-induced allergic conjunctivitis in BALB/c mice, in which pharmacological pretreatment with rGal-1 reduced eotaxin and RANTES levels in the lymph nodes compared with the untreated AC group after 24 hours of last challenge [9]. It was recently shown that the Gal-1-null mice presented increased OVA-induced airway inflammation demonstrated by increased number of eosinophils and lymphocytes in bronchoalveolar fluid and lung, and higher airway resistance relative to WT OVA-challenged mice [35]. In the same study, *in vitro* administration of rGal-1 exerted divergent effects on eosinophils that were N-glycan- and dose-dependent. At low concentrations ($\leq 0.25 \mu\text{M}$), rGal-1 inhibited ERK1/2 activation and eotaxin-1-induced migration of eosinophils while at high concentration ($\geq 1 \mu\text{M}$), induced ERK1/2-dependent apoptosis of eosinophils and decreased expression of adhesion molecules CD49d and CCR3. In our AD model, we also demonstrated systemic (spleen) and localized (skin) activation of ERK1/2 after treatment with rGal-1, supporting the important role of the MAPK signalling pathway of the immunomodulatory actions of Gal-1 in AD.

Finally, our immunohistochemistry studies demonstrated that elevated levels of Gal-1 in the dermis are associated with an increased infiltration of eosinophils. Both systemic treatments, rGal-1 and Dex, downregulated the expression of endogenous Gal-1 protein in the skin. Exposure to the allergen OVA resulted in increased Gal-1 expression in the lungs, eyes and conjunctiva due to the recruitment of Gal-1-expressing inflammatory cells, including eosinophils [9,35]. Expression of Gal-1 has been demonstrated in the nucleus, cytosol, and cell membranes as well as in the extracellular matrix of tissues despite the absence of a secretion signal sequence [4,7,9]. Extracellularly, Gal-1 contributes to cell adhesion as revealed by *in vitro* eosinophil migration assays which demonstrate increased adhesion of human eosinophils onto a Gal-1-coated substrate compared a P-selectin-coated substrate [36]. Furthermore, these studies show that exposure of eosinophils to exogenous Gal-1 significantly increased eosinophil cationic protein levels, suggesting a role of this lectin in eosinophil activation.

Overall, the data presented herein identify Gal-1 as a potential therapeutic agent to regulate AD, as it modulates specific phases of the inflammatory process with clear outcomes under *in vivo* conditions. We therefore propose that strategies aimed at potentiating the Gal-1 pathway may provide novel pharmacological approaches to the downregulation of the allergic inflammatory response in the skin.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2015/09858-3). MP CORREA was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Leung DY, Guttman-Yassky E (2014). Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. *J Allergy Clin Immunol* 134(4):769-79.
2. Schlapbach C, Simon D (2014). Update on skin allergy. *Allergy* 69(12):1571-81.
3. Dhingra N, Gulati N, Guttman-Yassky E (2013). Mechanisms of contact sensitization offer insights into the role of barrier defects vs. intrinsic immune abnormalities as drivers of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 133(10):2311-4.
4. La M, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai K, Oliani SM, Chernajovsky Y, Perretti M (2003). A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol* 163(4):1505-15.
5. Norling LV, Sampaio AL, Cooper D, Perretti M (2008). Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J* 22(3):682-90.
6. Gil CD, Cooper D, Rosignoli G, Perretti M, Oliani SM (2006). Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. *Inflamm Res* 55(3):99-107.
7. Gil CD, Gullo CE, Oliani SM (2010). Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. *Int J Clin Exp Pathol* 4(1):74-84.
8. Cooper D, Norling LV, Perretti M (2008). Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *J Leukoc Biol* 83(6):1459-66.
9. Mello CB, Ramos L, Gimenes AD, Andrade TR, Oliani SM, Gil CD (2015). Immunomodulatory effects of galectin-1 on an IgE-mediated allergic conjunctivitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(2):693-704.

10. Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, Jin YT, Hong TM, Chen YL (2008). Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27(26):3746-53.
11. Brandt B, Abou-Eladab EF, Tiedge M, Walzel H (2010). Role of the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death. *Cell Death Dis* 1:e23.
12. Auvynet C, Moreno S, Melchy E, Coronado-Martínez I, Montiel JL, Aguilar-Delfin I, Rosenstein Y (2013). Galectin-1 promotes human neutrophil migration. *Glycobiology* 23(1):32-42.
13. Arthur JS, Ley SC (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(9):679-92.
14. Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, Gallelli L, Caraglia M, Marra M, Abbruzzese A, Caputi M, Maselli R, Costanzo FS, Marsico AS (2005). Mitogen-activated protein kinases and asthma. *J Cell Physiol* 202(3):642-53.
15. Acciani TH, Suzuki T, Trapnell BC, Le Cras TD (2016). Epidermal growth factor receptor signalling regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by airway epithelial cells and established allergic airway disease. *Clin Exp Allergy* 46(2):317-28.
16. Kim HJ, Kim YJ, Kang MJ, Seo JH, Kim HY, Jeong SK, Lee SH, Kim JM, Hong SJ (2012). A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of *Lactobacillus rhamnosus*. *Exp Dermatol* 21(9):672-5.
17. Akimoto Y, Hirabayashi J, Kasai K, Hirano H (1995). Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. *Cell Tissue Res* 280(1):1-10.
18. Klíma J, Lacina L, Dvoránková B, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H, Kaltner H, Andre S, Motlík J, Gabius HJ, Smetana K (2009). Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiol Res* 58(6):873-84.
19. Matsuoka H, Maki N, Yoshida S, Arai M, Wang J, Oikawa Y, Ikeda T, Hirota N, Nakagawa H, Ishii A (2003). A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy* 58(2):139-45.
20. Li YZ, Lu XY, Jiang W, Li LF (2013). Anti-inflammatory effect of qingpeng ointment in atopic dermatitis-like murine model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:907016.
21. Kim H, Kim JR, Kang H, Choi J, Yang H, Lee P, Kim J, Lee KW (2014). 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone attenuates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. *PLoS One* 9(8):e104938.
22. Heo WI, Lee KE, Hong JY, Kim MN, Oh MS, Kim YS, Kim KW, Kim KE, Sohn MH (2015). The role of interleukin-17 in mouse models of atopic dermatitis and contact dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 40(6):665-71.
23. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG (2000). Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol* 30(5):1331-9.
24. Ma L, Xue HB, Guan XH, Shu CM, Wang F, Zhang JH, An RZ (2014). The imbalance of Th17 cells and CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) Treg cells in patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28(8):1079-86.
25. Leonardi S, Cuppari C, Manti S, Filippelli M, Parisi GF, Borgia F, Briuglia S, Cannavò P, Salpietro A, Arrigo T, Salpietro C (2015). Serum interleukin 17, interleukin 23, and interleukin 10 values in children with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDES): association with clinical severity and phenotype. *Allergy Asthma Proc* 36(1):74-81.

-
26. Shershakova N, Bashkatova E, Babakhin A, Andreev S, Nikonova A, Shilovsky I, Kamyshnikov O, Buzuk A, Elisyutina O, Fedenko E, Khaitov M (2015). Allergen-Specific Immunotherapy with Monomeric Allergoid in a Mouse Model of Atopic Dermatitis. *PLoS One* 10(8):e0135070.
 27. Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, Otsuka A, Honda T, Hanakawa S, Amano W, Iwakura Y, Nakae S, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K (2014). IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. *J Invest Dermatol* 134(8):2122-30.
 28. Cedeno-Laurent F, Barthel SR, Opperman MJ, Lee DM, Clark RA, Dimitroff CJ (2010). Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation. *J Immunol* 185(8):4659-72.
 29. Iqbal AJ, Cooper D, Vugler A, Gittens BR, Moore A, Perretti M (2013). Endogenous galectin-1 exerts tonic inhibition on experimental arthritis. *J Immunol* 191(1):171-7.
 30. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Taylor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y (1999). Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 190(3):385-98.
 31. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Rabinovich GA, Morelli A (2003). Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124(5):1381-94.
 32. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, Hirabayashi J, Rizzo LV, Rabinovich GA (2006). Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* 176(10):6323-32.
 33. de la Fuente H, Perez-Gala S, Bonay P, Cruz-Adalia A, Cibrian D, Sanchez-Cuellar S, Dauden E, Fresno M, García-Diez A, Sanchez-Madrid F (2012). Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *J Pathol* 228(2):193-203.
 34. Yu M, Eckart MR, Morgan AA, Mukai K, Butte AJ, Tsai M, Galli SJ (2011). Identification of an IFN- γ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest* 121(8):3133-43.
 35. Ge XN, Ha SG, Greenberg YG, Rao A, Bastan I, Blidner AG, Rao SP, Rabinovich GA, Sriramamarao P (2016). Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(33):E4837-46.
 36. Delbrouck C, Doyen I, Belot N, Decaestecker C, Ghanooni R, de Lavarelle A, Kaltner H, Choufani G, Danguy A, Vandenhoven G, Gabius HJ, Hassid S, Kiss R (2002). Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Lab Invest* 82(2):147-58.

Figure Legends

Figure 1. Effect of rGal-1 administration on skin in the AD model. (a-e) Macroscopic analyses of skin lesions were taken on the final day of the experiment (day 24). AD skin (c) exhibited erythema, erosion, and dryness whereas rGal-1 (d) and Dex (e) treatments abrogated this effect showing a similar skin appearance as controls (a, b). (f) Skin thickness. Data represents mean \pm SEM of skin thickness (mm) (n = 6/group). * P < 0.05; *** P < 0.001 vs Naive; & P < 0.05; && P < 0.001 vs Sham; ### P < 0.001 vs AD, ** P < 0.01 vs rGal-1 (ANOVA, Bonferroni post-test).

Figure 2. Effect of rGal-1 on systemic immune responses in the AD model. (a-g) Multiplex immunoassay of eotaxin (a), RANTES (b), IL-4 (c), IL-13 (d), IL-10 (e), IFN- γ (f), and IL-17 (g) in plasma. Values are expressed as the mean \pm SEM of the chemokines/cytokines (pg/ml; n = 6/group). # P < 0.05 vs AD (Kruskal-Wallis, Dunn post-test). (h) Western blot analysis of phosphorylated and total ERK levels in the pooled extracts of spleens (n = 3 animals/group) from mice with AD either untreated or treated with rGal-1 or Dex. Immunoreactive bands for ERK were semi-quantified by densitometry and are expressed as arbitrary units (a.u.) of the ratio of p-ERK/total ERK (data represents one illustrative blot from two independent experiments).

Figure 3. Histopathology of the skin. (a, e) Control (Sham and Naive). (b, f) AD characterized by significant infiltration of eosinophils (arrowheads; inset) and degranulated mast cells (arrows; inset) into the dermis. Pharmacological treatment with rGal-1 (c, g) and Dex (d, h) resulted in lesser infiltration of inflammatory cells. Stain: haematoxylin-eosin (a-d) and toluidine blue (e-h). Bars: 50 μ m (a-h) and 10 μ m (insets). (i, j) Quantitative analysis of eosinophils and mast cells in the skin. Data represent the mean \pm SEM of the cell number per mm² (n = 6 animals/group). * P < 0.05, *** P < 0.001 vs control groups (naive and sham); ### P < 0.05, #### P < 0.001 vs AD (ANOVA, Bonferroni post-test).

Figure 4. Effect of rGal-1 administration on local immune response in the AD model. (a-c) Multiplex immunoassay of skin homogenates to detect eotaxin (a), RANTES (b), and IFN- γ (c). Values are expressed as the mean \pm SEM of the chemokines/cytokine (pg/ml; n = 6/group). # P < 0.05 vs AD; + P < 0.05 vs rGal-1. (d, e) Western blot analysis to measure CD11b, mMCP6, EPX, phosphorylated and total ERK levels in the pooled extracts of mouse skins (n = 3 animals/group) from mice with AD untreated or treated with rGal-1 or Dex. GAPDH was used as a protein loading control. Immunoreactive bands for proteins were semi-quantified by densitometry and are expressed as arbitrary units (a.u.) of the ratio of CD11b, mMCP6 or EXP/GAPDH and p-ERK/total ERK (data represents one illustrative blot from 2-4 independent experiments). # P < 0.05, ## P < 0.01 (Kruskal-Wallis, Dunn post-test).

Figure 5. Expression of Gal-1 in the skin. rGal-1- and Dex-treated groups (b, c) displayed lower endogenous Gal-1 immunoreactivity in the epidermis (Ep) and dermis (De) compared to the AD group (a). (d) No staining was detected in the sample used as a negative control. Counterstain: Haematoxylin. Bars: 50 μ m. (e, f) Densitometric analysis of Gal-1 expression in the epidermis and dermis. (g) Immunoassay for Gal-1 detection in skin homogenates. Data represent mean \pm SEM of Gal-1 expression (a.u. or ng/ml; n=6 animals/group). # P <0.05 and ### P <0.001 vs AD (ANOVA, Bonferroni post-test).

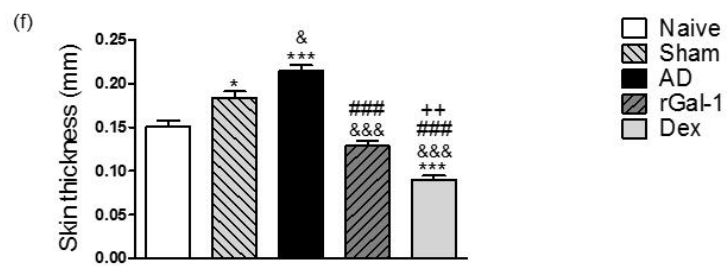
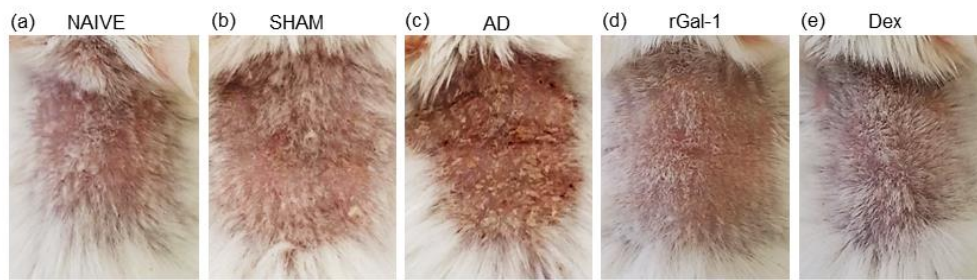


Figure 1

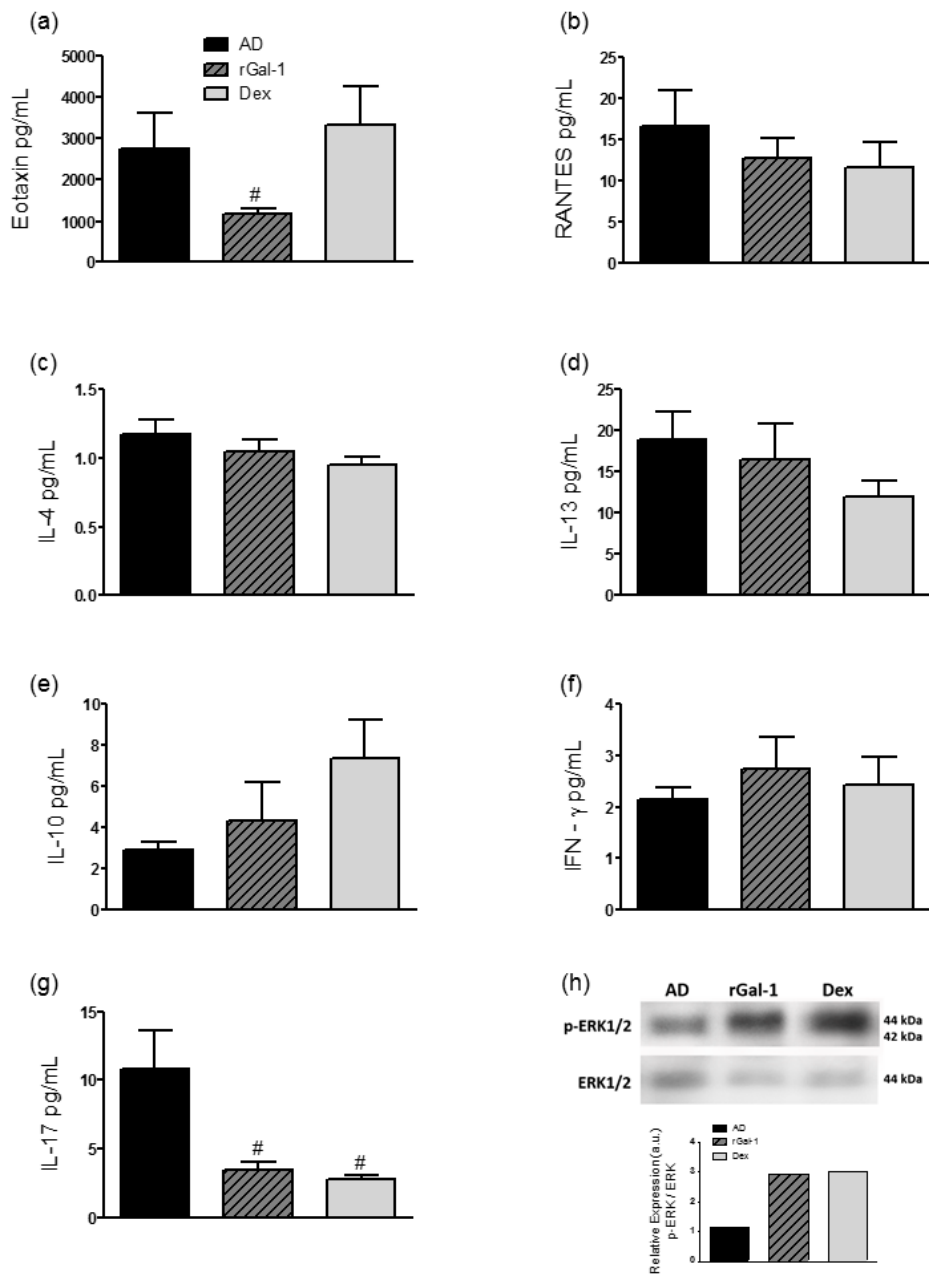


Figure 2

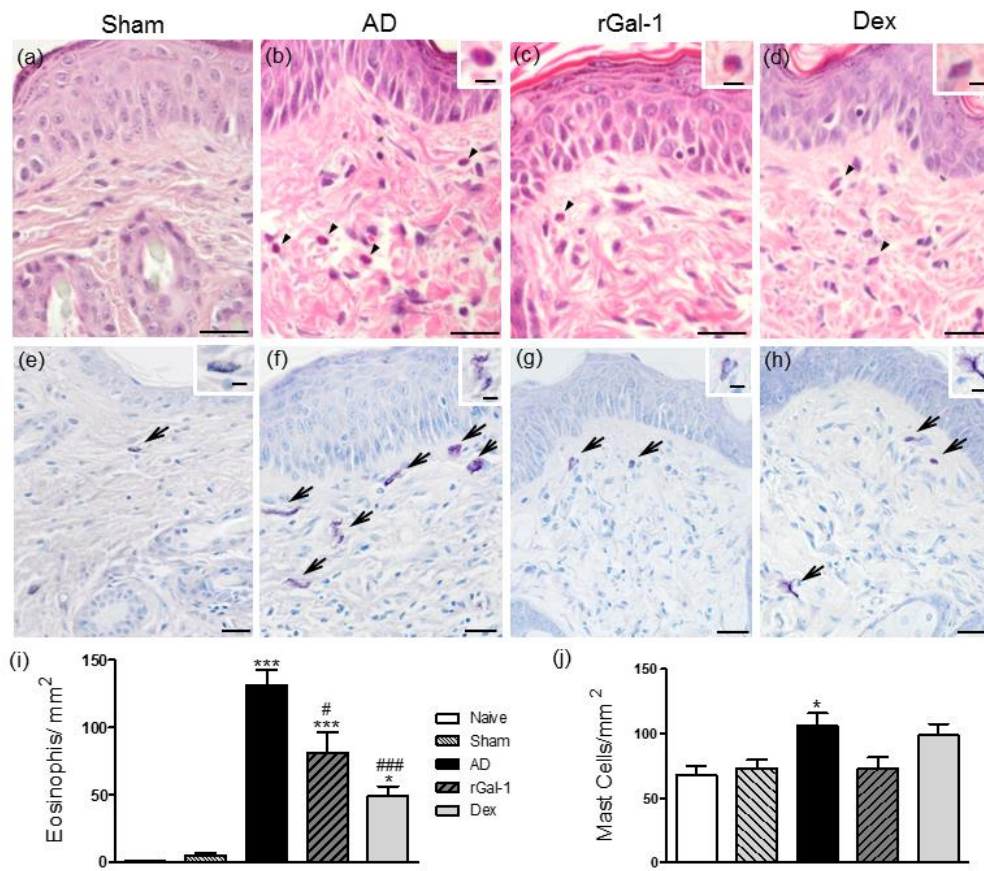


Figure 3

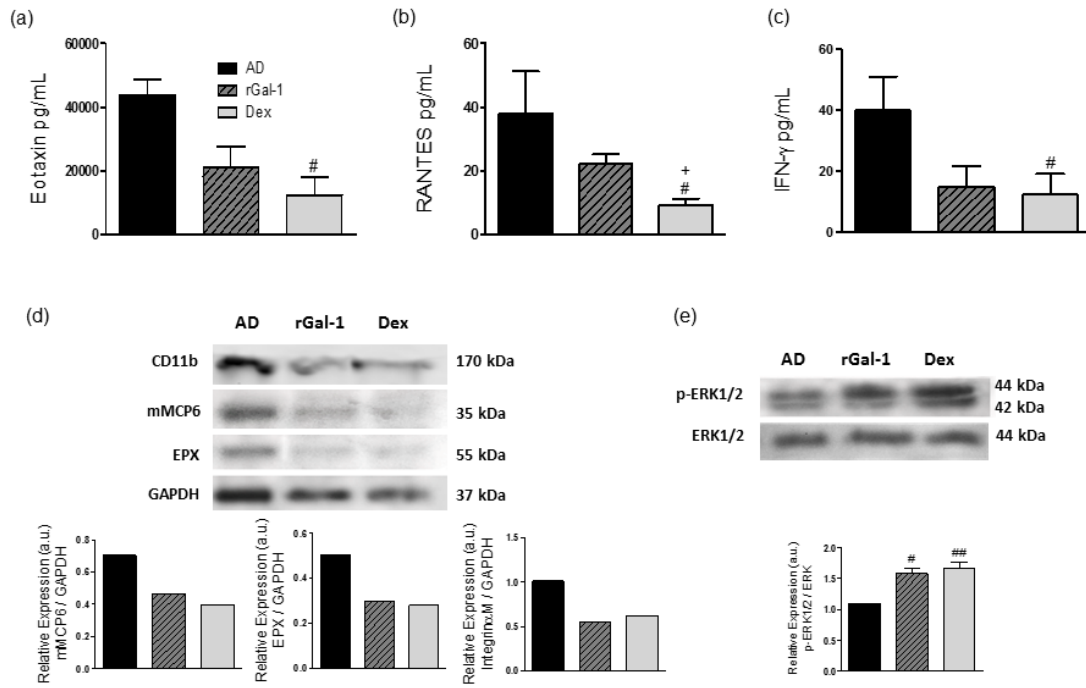


Figure 4

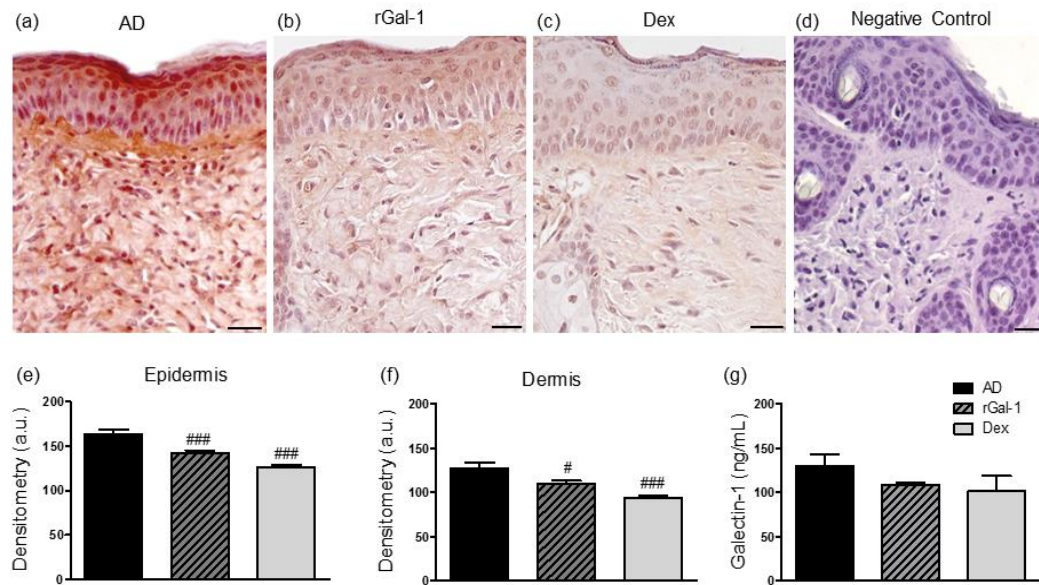


Figure 5

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Mab Pereira Corrêa