

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/03/2019.



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).

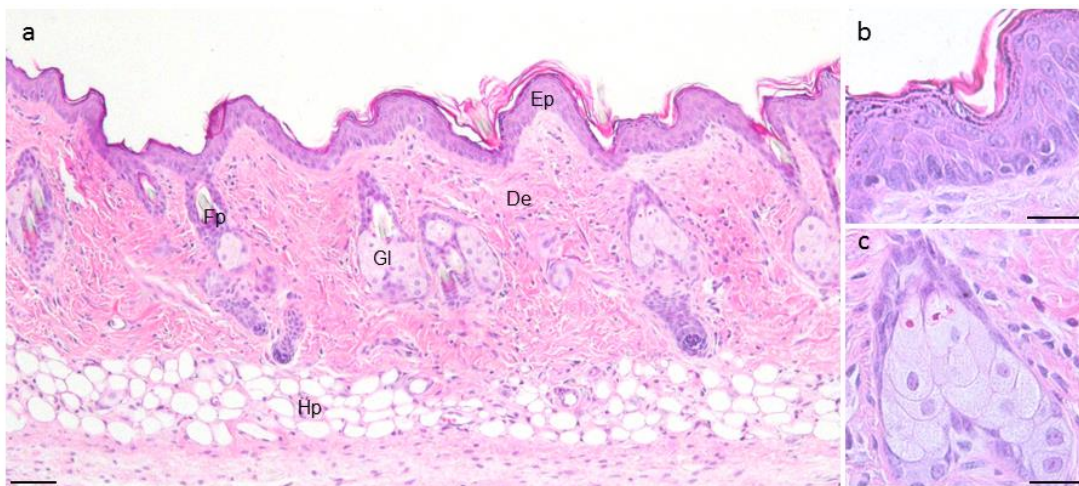


Figura 1. Pele fina de camundongo BALB/c. [a] Epiderme (Ep). Derme (De). Na derme, observam-se folículos pilosos (Fp) e glândulas sebáceas (Gl). Abaixo da derme está a hipoderme (Hp), constituída por tecido adiposo. [b] Epiderme constituída pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. [c] Detalhe 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).

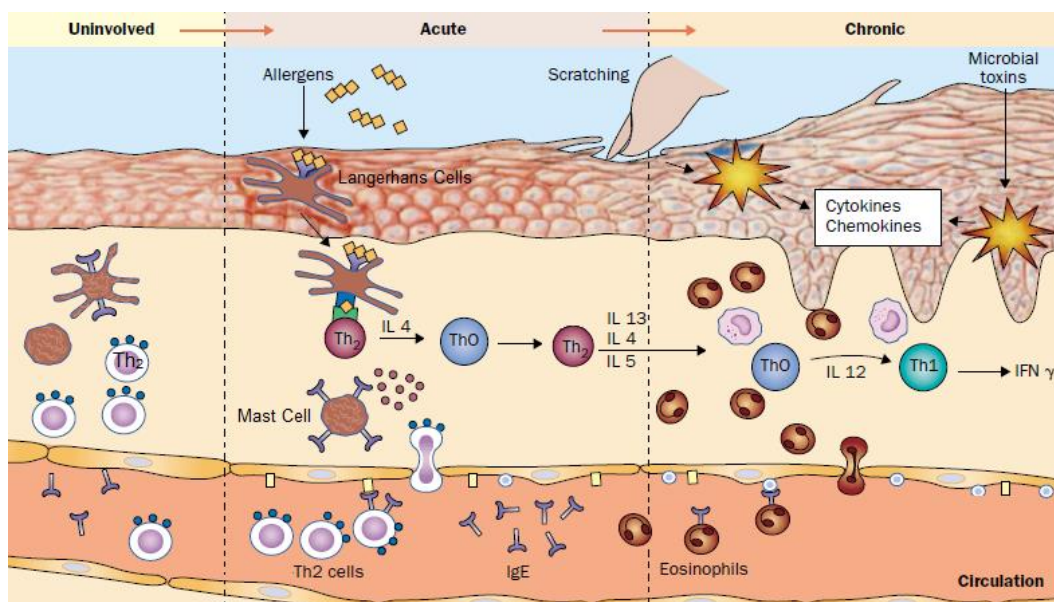


Figura 2 - Mecanismos imunológicos na patogênese da dermatite atópica (DA). No primeiro esquema observamos uma pele saudável. Na etapa seguinte, com a quebra da barreira epidérmica, há aumento da permeabilidade de antígenos, que se deparam com as células de Langerhans (LC), que por sua vez ativam as 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 efetoras 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).

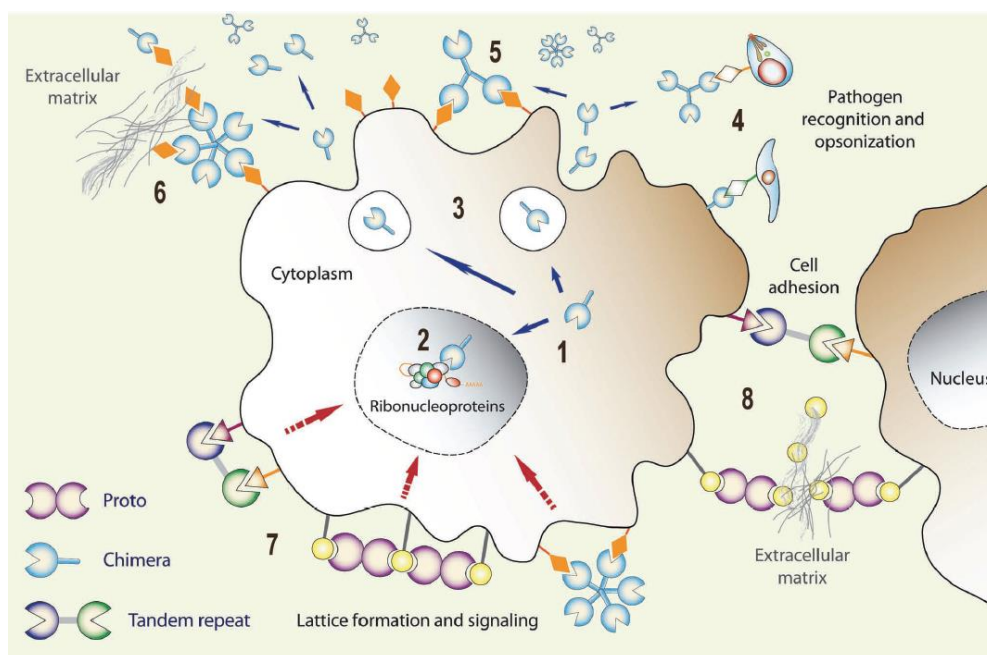


Figura 3 - Expressão, secreção e funções das galectinas. Os transcritos das galectinas são traduzidos no citoplasma (1) e as proteínas podem ser translocadas para o núcleo (2), local onde se associam com ribonucleoproteínas. Via mecanismos não convencionais, as galectinas são secretadas para o meio extracelular (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).

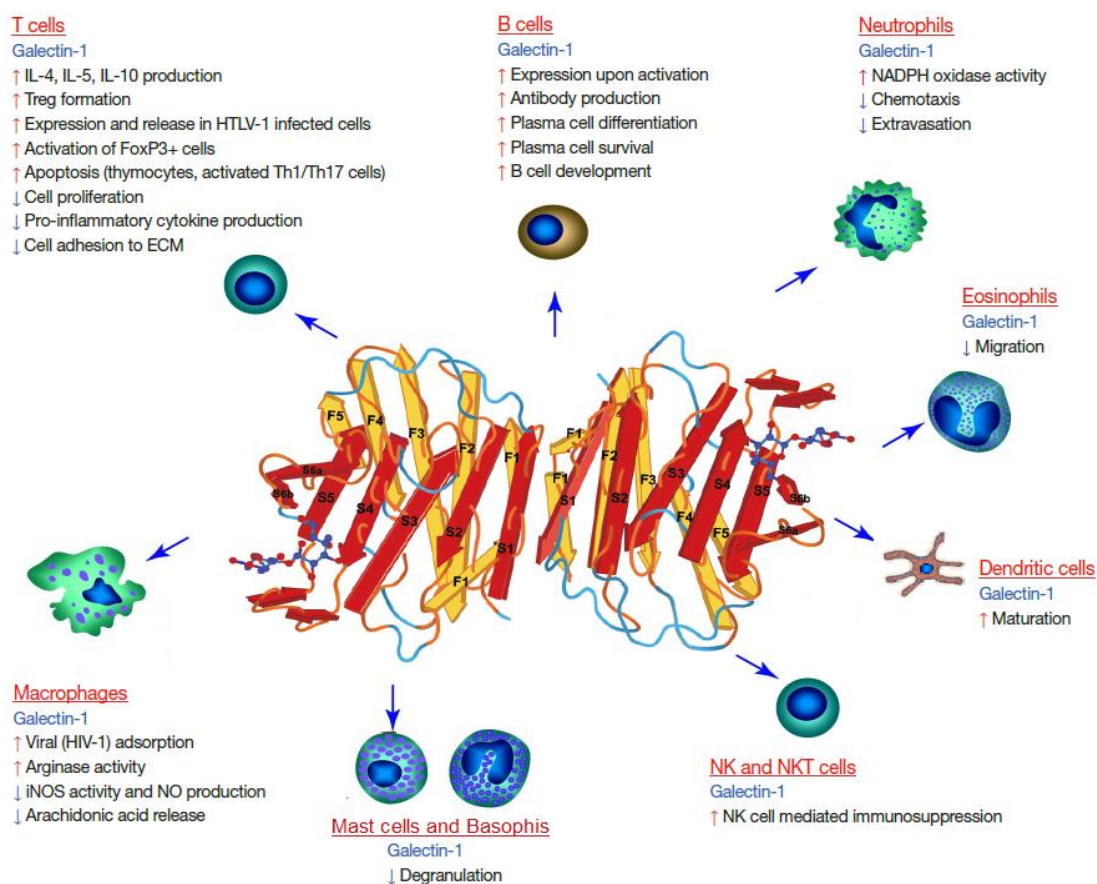


Figura 4 – Efeitos da Galectina 1 nas células do sistema imune. As setas vermelhas indicam ações regulatórias positivas da Gal-1, enquanto as azuis indicam ações negativas. Figura retirada de (Than et al, 2015, modificado).

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.