



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José do Rio Preto

Claudia Bosnic Mello

Efeito da Proteína Galectina-1 em Modelos Experimentais de  
Conjuntivite Induzida pelo Composto 48/80 ou Ovalbumina em Roedores

São José do Rio Preto  
2018

Claudia Bosnic Mello

Efeito da Proteína Galectina-1 em Modelos Experimentais de  
Conjuntivite Induzida pelo Composto 48/80 ou Ovalbumina em Roedores

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, 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.

Financiadora: Capes/FAPESP- Proc. 15/09858-3

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

São José do Rio Preto  
2018

Mello-Bosnic, C.

Efeito da proteína galectina-1 em modelos experimentais de conjuntivite induzida pelo composto 48/80 ou ovalbumina em roedores/  
Claudia Bosnic Mello. -- São José do Rio Preto, 2018  
89 f. : il.

Orientador: Cristiane Damas Gil

Coorientadora: Sonia maria Oliani

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

1. Farmacologia. 2. Proteínas. 3. Galectina 1. 4. Conjuntivite alérgica.  
5. Olhos- inflamação. 6. Proteínas quinases ativadas por mitógeno.  
I. Mello, Claudia Bosnic. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.  
III. Título.

CDU -615

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

Claudia Bosnic Mello

Efeito da Proteína Galectina-1 em Modelos Experimentais de  
Conjuntivite Induzida pelo Composto 48/80 ou Ovalbumina em Roedores

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, 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.

Financiadora: Capes/FAPESP- Proc. 15/09858-3

Profª Drª Cristiane Damas Gil  
UNIFESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Profª Drª Ana Paula Girol  
UNESP – São José do Rio Preto

Profª Drª Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari  
UNESP – São José do Rio Preto

Profª Drª Carla Patrícia Carlos  
FACERES – São José do Rio Preto

Profª Drª Ana Claudia Polli  
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
26 de fevereiro de 2018

*Dedico o presente trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida,  
que conhece a minha alma, guia o meus passos e sossega meu coração.*

*À minha família, sempre ao meu lado ao longo da minha caminhada e não me  
deixaram desistir, acreditaram em mim e com palavras incentivadoras e muito amor  
não mediram esforços para me apoiar: meus pais Prof. Dr. Mello e Prof<sup>a</sup> Francisca,  
às minhas irmãs Luciana e Fernanda, e ao meu filho Cesar Augusto  
Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que contribuíram direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho. Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer vocês. “O coração do homem pode fazer planos, mas a resposta certa dos lábios vem do SENHOR” (Provérbio 16-1).*

*Um agradecimento especial à minha orientadora Professora Doutora Cristiane Damas pelos anos de amizade, dedicação, paciência e sua valiosa orientação deste trabalho e por quem tenho profunda admiração.*

*À minha coorientadora Professora Doutora Sonia Maria Olini pela sua orientação e compreensão que os momentos difíceis enfrentados nesses últimos anos jamais me deixaram desistir e pela honra de tê-la como minha coorientadora.*

*À Kallyne Mimura, Mab Pereira Corrêa, Alexandre Dantas Gimenes, Lucas Ribeiro de Azevedo companheiros sempre prontos e dispostos a me auxiliar.*

*A todos os companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE: Carla Patrícia Carlos, Ana Paula Girol, Marina de Paula Silva, Marystela Fávero Oliveira, Rafaela Molás e outros pelo conhecimento compartilhado.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Júlio Mesquita (Ibilce-UNESP): à coordenação, professores e funcionários.*

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

*À Kátia de Vasconcelos do laboratório de Histologia da UNIFESP, pelo auxílio técnico no desenvolvimento deste trabalho.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro necessário para execução deste trabalho (processo no.15/09858-3).*

*"Tudo que está no plano da realidade já foi sonho um dia."  
(Leonardo da Vinci)*

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim, esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, quieta e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da alegria. E ainda mais no meio da tristeza. Todo o caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”.*

*(João Guimarães Rosa em “Grande Sertão Veredas”, 1956).*

## RESUMO

**Introdução.** A galectina-1 (Gal-1) é uma proteína de 14,5 kDa com afinidade aos  $\beta$ -galactosídeos que contribui para a homeostase da inflamação, regulando o processo de transmigração dos leucócitos e liberação de citocinas. Contudo, o papel da Gal-1 em olhos normais e inflamados tem sido pouco estudados. **Objetivo.** Analisar o efeito do tratamento farmacológico com a Gal-1 recombinante (rGal-1) nos olhos de roedores utilizando dois modelos experimentais de conjuntivite. **Métodos.** Para o modelo de conjuntivite alérgica (CA), camundongos Balb/c machos foram imunizados via subcutânea com 5  $\mu$ g de ovalbumina (OVA) nos dias 0 e 7. Nos dias 14-16, 0,3  $\mu$ g/animal de Gal-1 foi instilado no saco conjuntival seguida, após 15 min, do desafio com 250  $\mu$ g de OVA. Os animais SHAM (grupo controle) receberam soro fisiológico estéril. Após 4 e 24h do último desafio, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue, olhos e pálpebras. Para o outro modelo de conjuntivite, ratos Wistar machos receberam no saco conjuntival do olho direito instilação do composto 48/80 (C48/80; 100 mg/mL), um secretagogo dos mastócitos. Como controle, o olho contralateral (esquerdo) foi instilado apenas com PBS. Outros ratos receberam em ambos os olhos instilação de 0,3 ou 3  $\mu$ g/olho de Gal-1 ou 40 mg/mL de cromoglicato de sódio (SCG), e após 10 minutos, o C48/80 (olho direito) ou PBS (olho esquerdo - controle). Após 6h, os animais foram eutanasiados para coleta das pálpebras e olhos. **Resultados.** No modelo de CA, a instilação de Gal-1 diminuiu a proporção de mastócitos desgranulados e influxo de leucócitos na conjuntiva palpebral, assim como a produção de IFN- $\gamma$ , em comparação com o grupo CA não tratado. A conjuntivite induzida pelo C48/80 provocou edema de pálpebras, conjuntiva e lacrimejamento, sinais clínicos reduzidos pela administração de Gal-1 (0,3 e 3  $\mu$ g) e SCG. Corroborando esses achados, a administração do C48/80 aumentou a proporção de mastócitos desgranulados (62%,  $p < 0,01$ ) e influxo de eosinófilos na conjuntiva palpebral em comparação com o controle (32%). Os tratamentos com Gal-1 (0,3 e 3  $\mu$ g) e SCG reverteram esses efeitos, apresentando menor proporção de mastócitos desgranulados (31-36%) e eosinófilos, observações confirmadas pela presença de maiores níveis de histamina e peroxidase eosinofílica nos macerados dos olhos. Além disso, os tratamentos com Gal-1 (3  $\mu$ g) e SCG diminuíram os níveis de IL-4, bem como a ativação das quinases ativadas por



mitógenos (p38, ERK e JNK) em relação aos olhos ativados pelo C48/80 e não tratados. **Conclusão.** Nossos dados evidenciam que o tratamento farmacológico por instilação ocular de Gal-1 tem um potente efeito imunomodulador nos dois modelos de conjuntivite, indicando esta lectina como um importante alvo terapêutico na alergia ocular.

PALAVRAS-CHAVE: eosinófilo, inflamação, mastócito, olho, quinases ativadas por mitógeno.

## ABSTRACT

**Introduction:** Galectin-1 (Gal-1) is a 14.5 kDa protein with affinity for  $\beta$ -galactoside that contributes to inflammatory homeostasis, regulating leukocyte transmigration and cytokine release. However, the role of Gal-1 in normal and inflamed eyes has been little studied. **Objective:** To analyze the effect of pharmacological treatment with recombinant Gal-1 (rGal-1) on the eyes of rodents using two experimental models of conjunctivitis. **Methods:** Male Balb / c mice were divided into five groups (AC 4 / 24h; AC + rGal-14/24, sham), immunized subcutaneously with 5  $\mu$ g ovalbumin (OVA, grade V), and on days 14-16 pre-treated with instillation of r Gal-1 (0.3  $\mu$ g / animal) and challenged after 15 minutes with OVA with 250  $\mu$ g of OVA in the conjunctival sac. SHAM animals received sterile saline. After 4 and 24 hours of the last challenge the animals were euthanized for collection of blood, eyes and eyelids. In another set of experiments, male Wistar rats were divided into four experimental groups (I to IV) and controls (n = 6-10 / group). Conjunctivitis was induced by instillation of the compound 48/80 (C48 / 80) 100 mg / mL in the conjunctival sac of the right eye, group I. As control, the contralateral (left) eye was instilled only with PBS. Groups II, III and IV received pharmacological pre-treatment with 0.3  $\mu$ g / eye of rGal-1, 3  $\mu$ g / eye of rGal-1, and 40 mg / mL of sodium cromoglycate (SCG), respectively, and after 10 minutes, the 48/80 or PBS (control eyes) was instilled. After 6 hours, the animals were euthanized for collection of the eyelids and eyes.

**Results:** In the AC model the histological analysis of the palpebral conjunctiva showed a reduction in the proportion of degranulated mast cells (40%) compared to the untreated AC group (61%) after 24 h of the last OVA challenge. At the same experimental time, the effect of rGal-1 was also associated with lower influx of leukocytes to the palpebral conjunctiva. Thus, the exogenous action of Gal-1 is associated with the reduction of mast cell activation in the AC experimental model and, consequently, in the regulation of ocular allergy C48 / 80-induced conjunctivitis caused eyelid edema, conjunctiva and tearing, clinical signs that were associated with a significant increase in the proportion of degranulated mast cells in the palpebral conjunctiva compared to the control group and were reversed after rGal-1 (0.3 and 3  $\mu$ g) and sodium cromoglycate (40 mg / mL), confirming the regulatory effect of Gal-1 on mast cell activation. As expected, a significant increase in the proportion

*of degranulated mast cells (62%,  $p < 0.01$ ) and lower levels of histamine was exhibited after administration C48 / 80 compared to control (32%). This effect was reversed by rGal-1 and SCG treatments that reduced mast cell degranulation (31-36%), eosinophil migration and eosinophil peroxidase (EPX) expression in the eyes. Treatments with rGal-1 (3  $\mu\text{g}$ ) and SCG also decreased IL-4 levels, as well as the activation of mitogen-activated protein kinases (p38, ERK and JNK) compared to untreated C48 / 80 eyes. Conclusion: Our data evidenced that ocular pharmacological treatment by instillation of rGal-1 has a potent immunomodulatory effect in the two models of conjunctivitis, indicating this lectin an important therapeutic target in ocular allergy*

**KEYWORDS:** *eosinophil, eye, inflammation, mast cell, mitogen-activated protein kinases.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Anatomia da conjuntiva.....	16
<b>Figura 2.</b>	Alguns dos tipos de células e interações mais relevantes no sistema da superfície da mucosa ocular.....	17
<b>Figura 3.</b>	Resposta alérgica desencadeada pela produção de IgE.....	19
<b>Figura 4.</b>	Papeis regulatórios da Gal-1 na imunidade inata e adaptativa.....	22
<b>Figura 5.</b>	Complexidade da ativação do MC.....	26
<b>Figura 6.</b>	Protocolo experimental para indução da CA em camundongos.....	33
<b>Figura 7.</b>	Esquema de processamento das amostras nos os dois modelos de conjuntivite em roedores.....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Protocolo experimental para indução da conjuntivite induzida pelo composto 48/80 em ratos.....	35
<b>Tabela 2.</b> Avaliação clínica da conjuntivite alérgica.....	35
<b>Tabela 3.</b> Anticorpos primários policlonais utilizados.....	38

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Conjuntiva.....	16
1.2. Conjuntivite.....	18
1.3. Galectina-1.....	21
1.4. Mastócitos e sua Ativação.....	24
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Animais.....	32
3.2. Modelo Experimental de Conjuntivite Alérgica Induzido por Ovalbumina.....	32
3.2.1. Quantificação de Leucócitos no Sangue.....	33
3.2.2. Dosagem de IgE Anti-Ovalbumina e Citocinas.....	34
3.3. Modelo Experimental de Conjuntivite Induzido pelo Composto 48/80 em Ratos.....	34
3.3.1. Escore Clínico.....	35
3.3.2. Análise dos Níveis de Histamina.....	36
3.3.3. Análises de Quimiocinas e Citocinas por Painel Multiplex.....	36
3.3.4. <i>Western Blotting</i> .....	37
3.4. Fixação, processamento e inclusão para a microscopia de luz.....	38
3.5. Análises Estatísticas.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Manuscrito Submetido.....	41
5. DISCUSSÃO.....	65

5.1. Discussão Geral.....	66
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS.....	74
8. ANEXOS.....	84
8.1. Certificados de Aprovação dos Comitês de Ética.....	85
8.1.1. Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP	85
8.1.2. Comissão de Ética do Uso de Animais IBILCE/UNESP-CSJRP.....	88
8.2. Certificado de Submissão do Artido a Revista Científica.....	89
8.2.1. Clinical and Experimental Ophthalmology .....	89

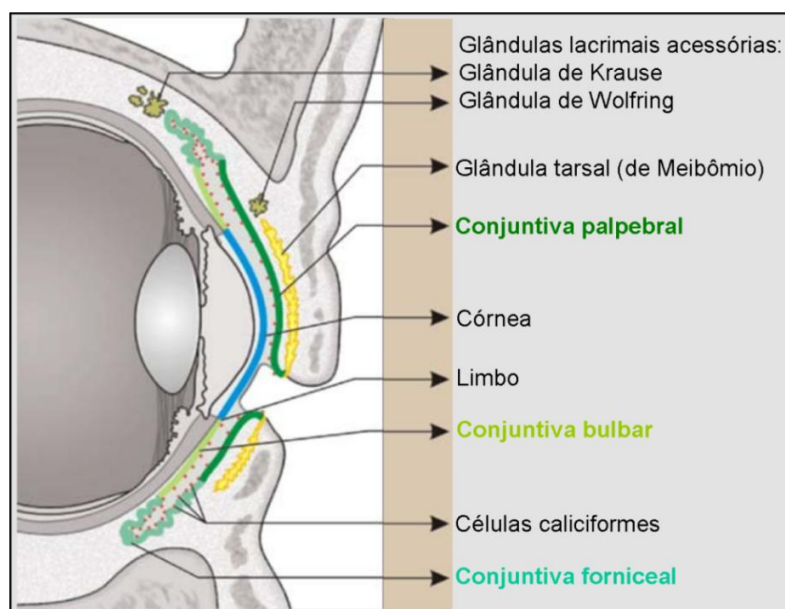




## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Conjuntiva

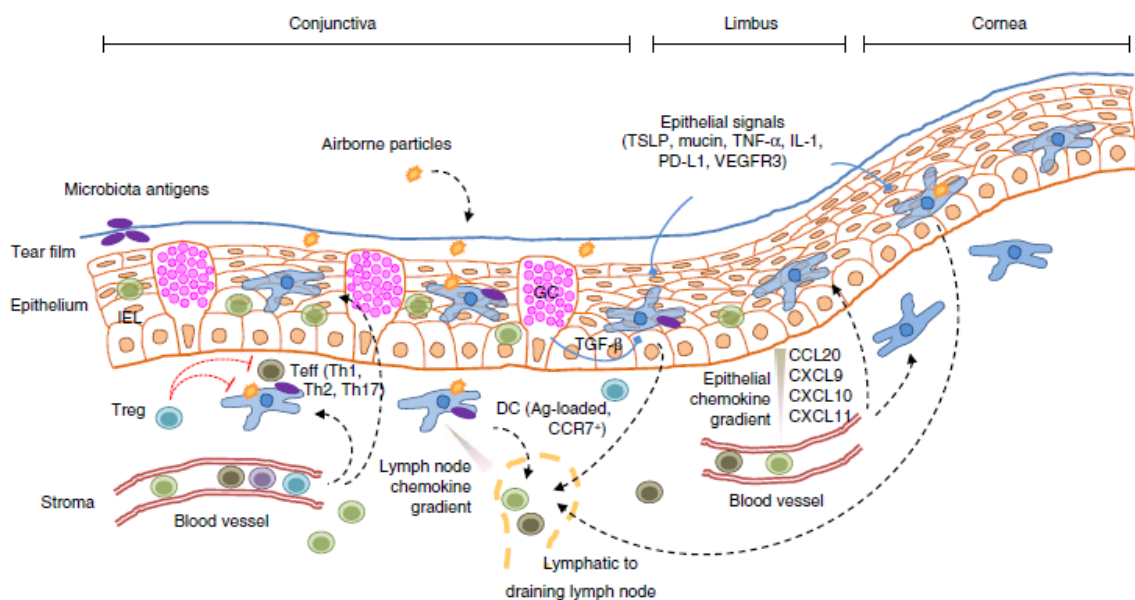
A conjuntiva, estrutura acessória do globo ocular, é uma membrana mucosa fina transparente. Anatomicamente, essa membrana está localizada na margem periférica da córnea, sobre a esclera (conjuntiva bulbar), fórnix do saco lacrimal (conjuntiva forniceal) e superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral) (Figura 1) (PAULSEN; BERRY, 2006; ROSS; PAWLINA, 2012). A conjuntiva apresenta epitélio estratificado formado por 2 a 8 camadas de células com forma cilíndrica a pavimentosa, dependendo de sua localização, sustentado pela lâmina própria composta de tecido conjuntivo frouxo. No epitélio podem ser observadas também células caliciformes, cuja secreção compõe o filme lacrimal, células de Langerhans e melanócitos (HOANG-XUAN; BAUDOUIN; CREUZOT-GARCHER, 2001). Ainda, na região da conjuntiva palpebral, podem ser localizadas as glândulas tarsais (de Meibômio), glândulas sebáceas que secretam camada oleosa que retarda a evaporação da camada lacrimal, e as glândulas lacrimais acessórias (de Krause e de Wolfring), glândulas de secreção serosa (ROSS; PAWLINA, 2012).



**Figura 1.** Anatomia da conjuntiva. A conjuntiva consiste em três segmentos: bulbar, forniceal e palpebral. Figura retirada e modificada de PAULSEN e BERRY (2006).

A conjuntiva é um local comum para a resposta inflamatória alérgica por ser altamente vascularizada, possuir tecido linfóide exclusivo associado e ser

constantemente exposta a poluentes ambientais e pólenes alergênicos. A morbidade primária de distúrbios conjuntivais da superfície anterior, que incluem a conjuntivite alérgica (CA) e os distúrbios do filme lacrimal, estão associados à sua alta frequência de desenvolvimento em vez de sua gravidade, embora as formas mais crônicas possam envolver a córnea e levam a condições de ameaça à visão (KOMI; RAMBASEK; BIELORY 2017). Assim, o sistema imunológico da superfície da mucosa ocular deve discriminar entre antígenos inofensivos e potencialmente perigosos para evitar a inflamação desnecessária. Esse sistema operacional representado pela figura 2 compreende mecanismos imunes inato e adaptativo que ajudam a manter a integridade homeostática e fisiopatológica da mucosa ocular (GALETTI et al., 2017).

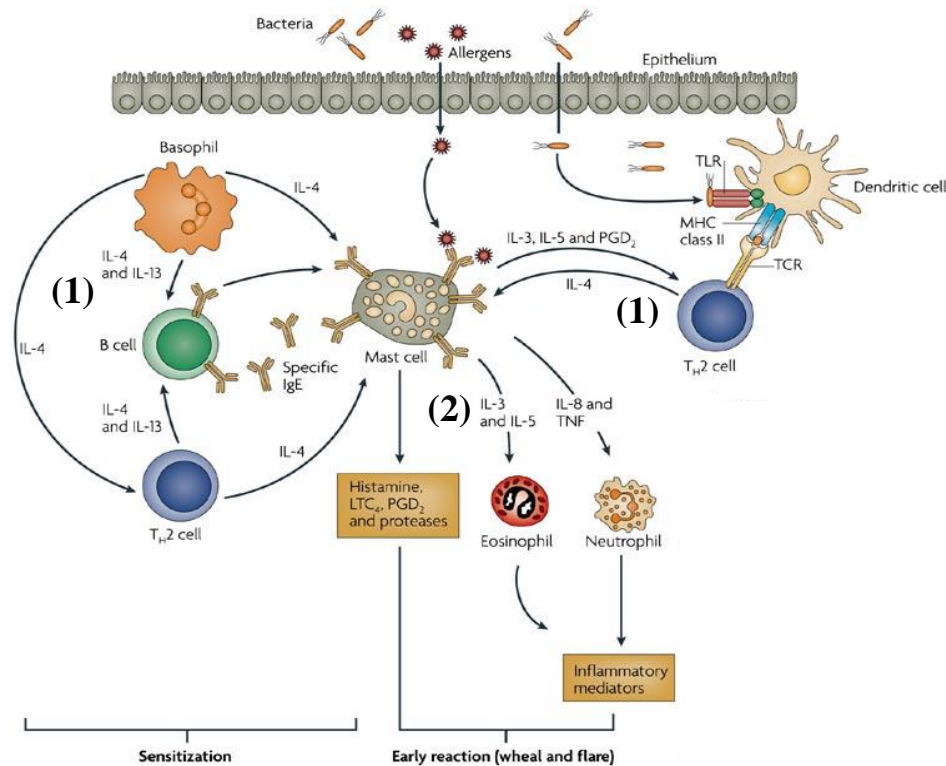


**Figura 2.** Alguns dos tipos de células e interações mais relevantes no sistema da superfície da mucosa ocular. Antígenos (Ag) transportados pelo ar e derivados da microbiota atingem o filme lacrimal, a camada mais externa da superfície ocular. As células epiteliais da conjuntiva e córnea, assim como as células calciformes (CG), formam a barreira epitelial onde também residem células dendríticas epiteliais (DC) e linfócitos intraepiteliais (IEL). Entre todos esses tipos celulares ocorre um extenso *crosstalk* por meio de fatores solúveis e receptores de membrana: fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), linfopoetina estromal tímica (TSLP), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), ligante da proteína de morte programada-1 (PD-L1) e receptor do fator de crescimento endotelial vascular-3 (VEGFR-3), entre outros. As células epiteliais também secretam as quimiocinas CCL20 e CXCL9-11, que atraem linfócitos e DCs. Entre os linfócitos, destacam-se as células T reguladoras (Treg) e efetoras (Teff) que desempenham um papel fundamental na tolerância da mucosa, reprimindo ou favorecendo a inflamação, respectivamente. Figura retirada de GALETTI et al. (2017).

## 1.2. Conjuntivite

Em 2001, o Comitê de Revisão da Nomenclatura da Organização Mundial de Alergia (WAO) propôs uma classificação para a conjuntivite baseada nas reações de hipersensibilidades (JOHANSSON et al., 2001): conjuntivite alérgica (CA) mediada ou não pela IgE, e conjuntivite não alérgica. Em 2012, Leonardi e colaboradores, atualizaram essa classificação incluindo a fisiopatologia das conjuntivites. Assim, no grupo conjuntivite alérgica (CA) mediada pela IgE estão incluídas a CA sazonal, CA perene, ceratoconjuntivite primaveril (VKC) e ceratoconjuntivite atópica (AKC - representa uma manifestação ocular da dermatite atópica). No grupo CA não mediada pela IgE constam a blefaroconjuntivite de contato, e também VKC e AKC. No grupo conjuntivite não alérgica, a conjuntivite papilar gigante, conjuntivite irritativa e blefarite irritativa estão incluídas. Dentre as conjuntivites a CA sazonal e perene são as mais comuns e brandas, afetando de 15-20% da população, enquanto as ceratoconjuntivites representam as formas mais severas e podem afetar a córnea e, conseqüentemente apresenta, risco para a visão (FRIEDLAENDER, 2011; LEONARDI et al., 2015; SHAKER; SALCONE, 2016).

A CA é definida como uma resposta inflamatória iniciada por reações de hipersensibilidade do tipo I (anafilática; IgE dependente e mediada por mastócitos e basófilos) e/ou IV (tardia; mediada por células T de memória) após exposição a um alérgeno (IRKEC; BOZKURT, 2012; DELVES et al., 2013). Portanto, a CA representa uma doença complexa do sistema imune envolvendo a desgranulação dos mastócitos na conjuntiva e a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas que provocam a infiltração de células inflamatórias nesse tecido (MARBACK et al., 2007; FRIEDLAENDER, 2011). A figura 3 ilustra esses processos complexos celulares e moleculares envolvidos na CA.



**Figura 3.** Resposta alérgica desencadeada pela produção de IgE. A ativação dos mastócitos pela reação cruzada alérgeno-IgE cria um ambiente de citocinas dominado pela IL-4 e pela IL-13 (1) que favorecem o desenvolvimento de células Th2, a síntese de IgE pelos linfócitos B diferenciados e aumento da liberação de mediadores pelos mastócitos (2). A subsequente liberação de mediadores, tais como histamina, leucotrienos, IL-3 e IL-5, causa uma resposta inflamatória caracterizada por vasodilatação, migração de neutrófilos e eosinófilos, ativação de Th2, quebra da barreira epitelial, aumento na produção de secreção pelas células epiteliais, ocasionando o surgimento dos sinais clínicos da conjuntivite. Figura retirada e modificada de BISCHOFF (2007).

A resposta inflamatória da conjuntiva pode ser causada por agentes infecciosos, tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas, ou por agentes não infecciosos, tais como substâncias químicas, lentes de contato e alergia (PELIKAN, 2011). Essa inflamação é o principal fator contribuinte para inúmeras desordens oculares, que normalmente afeta estruturas adjacentes como córnea, as vias lacrimais e as pálpebras podendo levar à diminuição da acuidade visual, e até mesmo à cegueira (MARBACK et al., 2007; PELIKAN, 2011). Os sintomas e sinais da doença variam de acordo com o tipo de conjuntivite, mas de forma geral os indivíduos apresentam vermelhidão, irritação, edema de pálpebra e conjuntiva, secreção aquosa ou purulenta do olho. Ainda, o prurido e a fotofobia costumam ser bastante intensos em alguns

casos, particularmente nos processos alérgicos, com possibilidade de lesões em córnea e, conseqüente risco para a visão (ROSARIO; BIELORY, 2011; FRIEDLAENDER, 2011; LEONARDI et al., 2015; SHAKER; SALCONE, 2016).

Nesse contexto, a CA é particularmente importante, pois estudos demonstram que 20-30% da população de países industrializados, tais como os Estados Unidos, sofre com problemas de alergia, dos quais 40-60% correspondem a alergias oculares. Ainda, estudos epidemiológicos demonstram alta taxa de indivíduos que sofrem de alergias oculares associadas a outras manifestações alérgicas como rinite e asma (ROSARIO; BIELORY, 2011; GERALDINE et al., 2013; LEONARDI et al., 2015).

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

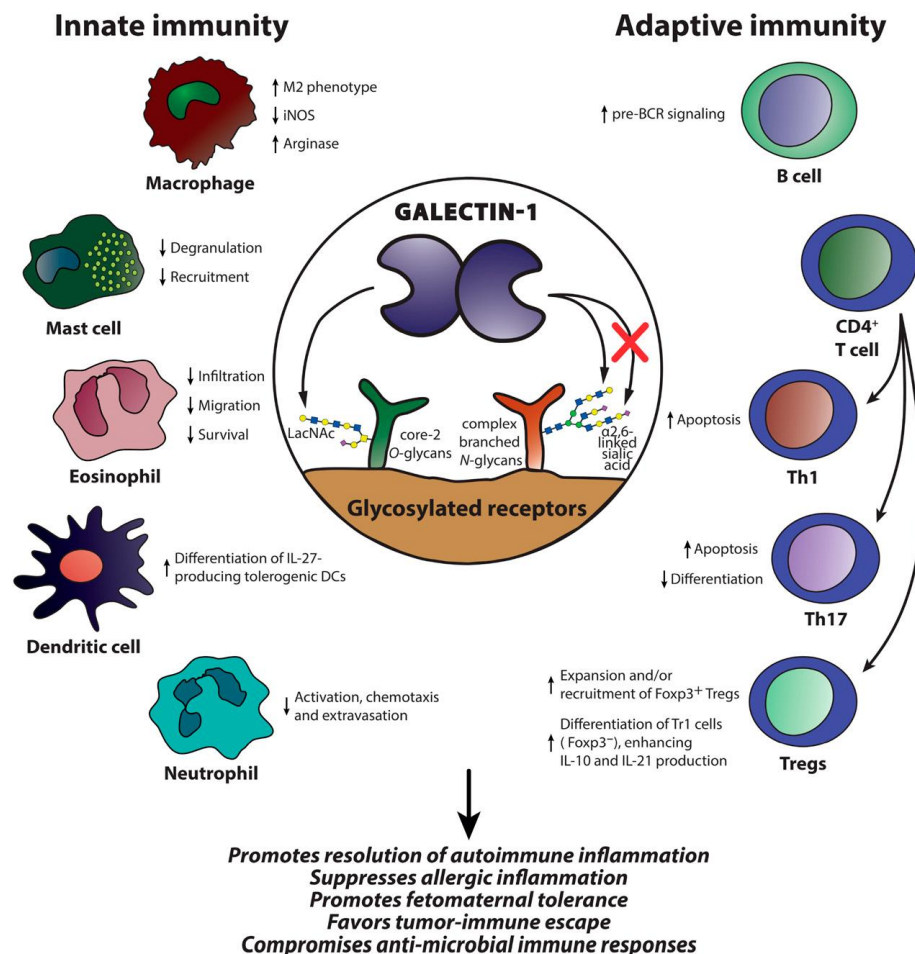
Diante dos dados abordados, o estudo da CA por meio de modelos experimentais representa uma ferramenta fundamental. Os modelos experimentais de alergia ocular têm sido desenvolvidos utilizando-se, principalmente, três espécies animais de laboratório (cobaia, rato e camundongo) imunizados com uma variedade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

O tratamento farmacológico dos processos inflamatórios oculares, especialmente a CA, inclui anti-histamínicos, estabilizadores da membrana de mastócitos, anti-inflamatórios não esteroides e corticosteroides. Esses últimos, utilizados nas conjuntivites mais severas e com maior risco de efeitos adversos, como o aumento da pressão intraocular e cataratogênese (FRIEDLAENDER, 2011; PACHARN; VICHYANOND, 2013; LEONARDI et al., 2015). Nesse aspecto, a investigação de novos agentes farmacológicos que tenham maior eficácia no controle da resposta inflamatória com menos efeitos adversos é fundamental. Ressaltamos como potencial agente anti-inflamatório a galectina-1 (Gal-1), proteína de 14,5 kDa que regula o processo inflamatório e cujas propriedades foram avaliadas em vários modelos de inflamação crônica e autoimunidade, incluindo encefalomielite autoimune, artrite, uveíte e hepatite (RABINOVICH et al., 1999; SANTUCCI et al., 2000; TOSCANO et al., 2006; HOKAMA, MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2008; ILARREGUI et al., 2009).

### 1.3. Galectina-1

As galectinas pertencem a uma família de proteínas com afinidade aos  $\beta$ -galactosídeos com uma sequência conservada de 135 aminoácidos no domínio reconhecedor de carboidrato-CRD (LEFFLER et al., 2002). Essas lectinas são amplamente expressas em locais de inflamação, infecção e crescimento de tumores, representando uma nova classe de DAMPs ou RAMPs (padrões moleculares associados ao dano ou resolução, respectivamente) que ampliam ou resolvem as respostas inflamatórias (SATO et al., 2009; MÉNDEZ-HUERGO et al., 2017; SUNDBLAD et al., 2017). Em mamíferos, 15 membros dessa família foram descritos e clonados (LIU; RABINOVICH, 2010). Com base na organização estrutural, as galectinas são classificadas em três subfamílias: prototípicas, *tandem-repeats* (do tipo repetições em sequência) e quiméricas. As galectinas prototípicas (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, e 15) são compostas por um único tipo de CRD (~15 kDa) e, podem se dimerizar, formando homodímeros com dois CRDs (~30 kDa) A subfamília *quimérica* tem como único representante a galectina-3 (~30 kDa), e possui um CRD e um domínio aminoterminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina. A terceira subfamília, *tandem-repeats* (galectinas 4, 6, 8, 9 e 12) apresentam dois CRDs distintos e homólogos (LIU; RABINOVICH, 2010).

A expressão da Gal-1 foi observada em várias células relacionadas com a resposta inflamatória, especialmente neutrófilos e mastócitos (GIL et al., 2006a; GIL et al., 2006b), macrófagos (RABINOVICH et al., 1998), linfócitos T e B (BLASER et al., 1998; ZUÑIGA et al., 2001) e células endoteliais (LA et al., 2003; GIL et al., 2006a; GIL et al., 2006b), sugerindo um importante papel na geração e manutenção da tolerância imunológica. Uma vez sintetizada, as galectinas podem permanecer dentro da célula e controlar os processos intracelulares, ou podem ser liberadas para o espaço extracelular através de uma via não convencional que ainda permanece desconhecida (CHO; CUMMINGS, 1995; LIU; PATTERSON; WANG, 2002). Além disso, em sítios imunoprivilegiados a expressão de Gal-1 é proeminente, tais como placenta, testículos e o olho, e aumenta ou diminui em condições inflamatórias, incluindo infecção microbiana, auto-imunidade, alergia, câncer, distúrbios reprodutivos, doenças neurodegenerativas e infarto do miocárdio (SUNDBLAD et al 2017). A figura 4 ilustra os diferentes papéis da Gal-1 nas células envolvidas em respostas inflamatórias agudas e crônicas.



**Figura 4.** Papeis regulatórios da Gal-1 na imunidade inata e adaptativa. Ao interagir com uma variedade de receptores glicosilados, a Gal-1 ativa programas regulatórios que controlam a homeostasia de células imunes. A Gal-1 promove a resolução da inflamação aguda, modulando o destino e a função das células imunes inatas, incluindo macrófagos, DCs, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos. Em contraste, esta lectina controla programas imunes adaptativos, modulando a sobrevivência e a diferenciação dos linfócitos Th1 e Th17 e facilitando os circuitos tolerogênicos mediados pelas DCs e linfócitos Tregs. Além disso, a Gal-1 modula a transição dos linfócitos B para o fenótipo de plasmócitos ou células B de memória. Esses programas regulatórios dependentes de glicanos podem promover a resolução de inflamações auto-imunes e alérgicas, favorecer a tolerância fetomaterna, facilitar a imunidade tumoral, e comprometer as respostas imunes antimicrobianas. Figura retirada de SUNDBLAD et al., 2017.

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; GIL et al., 2006a; COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008; ZANON et al., 2015). Nos modelos *in vitro* a incubação com a rGal-1 inibiu a migração dos neutrófilos (LA et al., 2003) e linfócitos humanos (NORLING et al., 2008) através das células endoteliais após estímulo inflamatório com a citocina IL-8 ou TNF- $\alpha$ , respectivamente. Nas investigações dos modelos *in vivo*, os efeitos da rGal-1 foram associados com a inibição da desgranulação dos mastócitos na pata de ratos após administração da fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha (RABINOVICH et al., 2000) e do extravasamento dos neutrófilos para a cavidade peritoneal e humor aquoso, após 4h da aplicação da carragenina em ratos (GIL et al., 2006a), do zymosan (GIL; GULLO; OLIANI, 2010), e IL-1 $\beta$  em camundongos (LA et al., 2003) e, após 24h do lipopolissacarídeo em ratos (ZANON et al., 2015). Esse efeito anti-imigratório da Gal-1 parece estar associado à modulação da expressão das moléculas de adesão (L-selectina e  $\beta$ 2-integrina) na superfície dos leucócitos e não às relacionadas ao endotélio (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) (COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008; NORLING et al., 2008; GIL; GULLO; OLIANI, 2010; ZANON et al., 2015).

Em modelos experimentais de doenças autoimunes, a Gal-1 é capaz de alterar a secreção de citocinas, reduzindo os níveis de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e IL-12, e aumentando os de IL-5 e IL-10 (RABINOVICH et al., 1999; SANTUCCI et al., 2003; TOSCANO et al., 2006) conseqüentemente, regulando a atividade dos linfócitos. Ainda, em modelo de hipersensibilidade tardia, um intenso recrutamento de linfócitos foi observado nas patas de camundongos



nocautes para Gal-1 em relação aos selvagens, demonstrando seu papel no controle da migração desse tipo celular (NORLING et al., 2008).

Estudos do nosso laboratório utilizando modelo experimental de CA induzida por ovalbumina em camundongos, mostraram 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). Mais recentemente demonstramos que o tratamento com a rGal-1 é eficaz na diminuição dos sinais clínicos da dermatite a tópica experimental induzida por ovalbumina, assim concomitante à diminuição do influxo de eosinófilos e mastócitos e produção de IL-17 (CORRÊA et al., 2017).

#### **1.4. Mastócitos e sua Ativação**

Os mastócitos (MCs) são provenientes de células pluripotentes CD34<sup>+</sup> da medula óssea, que migram para os tecidos e se diferenciam em células maduras pela influência de diversos fatores e citocinas que induzem o desenvolvimento do conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos, ricos em histamina, glicosaminoglicanos e proteases específicas (ARTUC et al., 1999; HERMES et al., 2000; DOUAIHER et al., 2014).

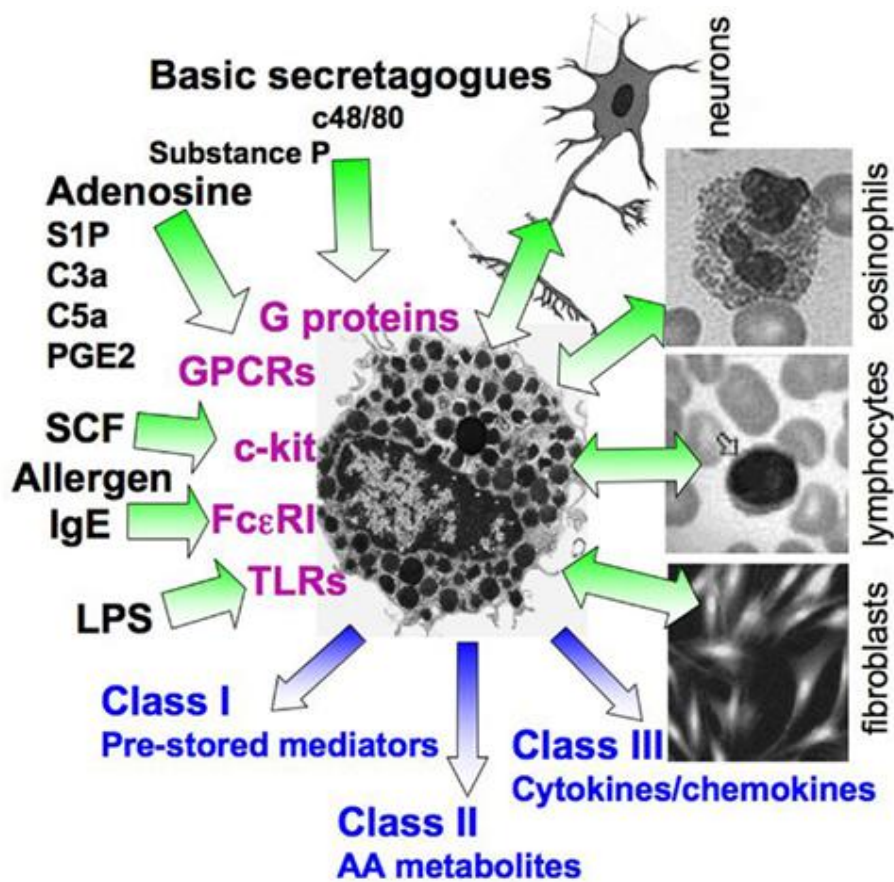
Os precursores dos mastócitos migram da circulação para os tecidos periféricos, onde se relacionam intimamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos periféricos e superfícies epiteliais (GALLI, GRIMBALDESTON; TSAI, 2008). Nesses locais, sob a influência do fator de células-tronco (SCF) e outras citocinas localmente produzidas como interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-9 e IL-10, expressam o fenótipo final, ou seja, mastócitos de tecido conjuntivo (CTMC) ou de mucosa (MMC), assim denominados em roedores (GALLI; GRIMBALDESTON; TSAI, 2008; GURISH, AUSTEN, 2012). Em humanos, a heterogeneidade dos mastócitos é baseada em dois subtipos, classificados pelas serina proteinases estocadas em seus grânulos citoplasmáticos: mastócitos que contêm triptase/quimase (MC<sub>TC</sub>) ou somente triptase (MC<sub>T</sub>) (PEJLER, RÖNNBERG et al., 2010).

Ambos os tipos de MCs expressam receptores FcεRI na membrana plasmática, de alta afinidade para a região Fc da imunoglobulina E monomérica (IgE). Dessa maneira, o conteúdo dos grânulos dos MCs pode ser liberado por meio de sua ativação pela ligação da IgE aos receptores FcεRI, mas também, por ligação de IgG,

ativação dos receptores *toll-like* por produtos microbianos (HARVIMA, NILSSON, 2011; DA SILVA, JAMUR; OLIVER, 2014), proteínas do sistema complemento C3a e C5a, neuropeptídeos, fator de célula-tronco (SCF) (ARTUC et al., 1999; HARVIMA, NILSSON, 2011; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014), TNF, IL-2, IL-8, prostaglandinas, leucotrienos (ARTUC et al., 1999), glicocorticoides, IL-1 $\beta$ , IL-6 (DOUAIHER et al., 2014), além de drogas e estímulos físicos (DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014).

Apesar dos seus papéis fisiológicos benéficos na imunidade e na cicatrização de feridas, os MCs são mais conhecidos por seu envolvimento em doenças alérgicas e inflamatórias, incluindo doenças autoimunes, neurodegenerativas e câncer, onde contribuem significativamente para a complexidade dessas doenças (GALLI, 1995; THEOHARIDES; KALOGEROMITROS, 2006; BISCHOFF, 2007). A alergia envolve a ativação e subsequente desgranulação de MCs, onde a ativação pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos externos. O gatilho imunológico envolve a produção de anticorpos de classe IgE, específicos para uma ampla gama de alérgenos, ligação de IgE ao seu receptor Fc $\epsilon$ RI e consequente ativação celular (GILFILLAN; TKACZYK, 2006; RIVERA; GILFILLAN, 2006; WILSON; OLIVER; LIDKE, 2011; KOMI; RAMBASEK; BIELORY 2017).

Além disso, os MCs podem ser ativados de forma independente de IgE, por uma variedade de estímulos solúveis (Figura 5), bem como através de interações com células vizinhas, incluindo fibroblastos, eosinófilos, linfócitos T e células nervosas (PUXEDDU et al., 2005; RUDICH; RAVID; SAGI-EISENBERG, 2012). Essas interações são complexas e envolvem *loops* de feedback, por exemplo, os MCs ativam os eosinófilos, que por sua vez liberam proteínas que ativam mais MCs (PUXEDDU et al., 2005).



**Figura 5.** Complexidade da ativação do MC. Ilustração dos múltiplos estímulos que podem ativar MCs. Os estímulos incluem a via imunológica mediada por IgE, as interações com células vizinhas, como eosinófilos, linfócitos T e fibroblastos, patógenos que atuam através dos receptores tipo *Toll* (TLRs), o SCF (ligante c-kit) e numerosos estímulos que ativam as proteínas G, diretamente (por exemplo, o secretagogos básicos, tais como o sintético C48/80) ou por ligação aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs; por exemplo, adenosina, peptídeos derivados do complemento, prostaglandinas, tais como PGE<sub>2</sub>, citocinas, entre outros). Dependendo do tipo de estímulo, os MCs ativados podem liberar mediadores pré-formados e estocados em seus grânulos citoplasmáticos (mediadores de classe I), bem como mediadores recentemente sintetizados, incluindo metabólitos do ácido araquidônico (AA; mediadores de classe II, como prostaglandinas e leucotrienos), citocinas, e quimiocinas (mediadores de classe III), ou somente liberar um subconjunto de mediadores. Em alguns casos, os estímulos distintos interagem sinergicamente, resultando em uma resposta ampliada. Figura retirada de RUDICH; RAVID; SAGI-EISENBERG, 2012.

Estudos revelam que algumas drogas, tais como venenos, toxinas, morfina, penicilinas, substância P, dextran, alcaloides, e aminas são capazes de induzir a liberação da histamina sem sensibilização prévia. Esse tipo de liberação não requer energia e não está associado à lesão celular, sendo esta ação caracterizada pela

atuação sobre o cálcio intracelular (JOHNSON et al., 1975; WAND et al 1994; FERRY et al., 2002), assim como observado para o composto 48/80 (FERRY et al. 2002; RUDICH; RAVID; SAGI-EISENBERG, 2012).

O C48/80 é um produto da condensação do N-metil-p- metoxifenetilamina com formaldeído (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO), que resulta na formação de polímeros de baixo peso molecular, normalmente com grau de polimerização entre 3 a 6 unidades poliméricas. Esse composto possui a propriedade de causar a desgranulação de mastócitos (SUGIMOTO et al., 1998; KIM et al., 1999; OHTA; KONGO; KIISHIKAMA, 2002; De VASCONCELOS et al., 2011; SUH et al., 2011) via ativação dos subtipos de proteína G (subtipo G<sub>i2</sub> e G<sub>i3</sub>). Estudos demonstram que sua ação ocorre diretamente na membrana de mastócitos ligando-se a receptores associados à proteína G, os quais ativam a fosfolipase D, com conseqüente aumento da atividade da proteína quinase C e do fluxo de cálcio intracelular, ocorrendo a ativação dos mastócitos (WANG et al., 1994, PALOMAKI; LAITINEN, 2006). As mudanças iniciais promovidas pelo C48/80 ocorrem na superfície da célula e são compostas por duas fases, uma que se caracteriza pelo rápido aumento do cálcio intracelular e outra caracterizada por uma contínua liberação do cálcio intracelular (FERRY et al., 2002). Isto culmina na exocitose dos mediadores biológicos contidos nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos.

Diante dessas considerações e da necessidade de novas terapias em substituição às atuais que apresentam o risco de efeitos adversos (READ et al., 2006; ROSENBAUM, 2010) nos tratamentos de conjuntivite e outros processos inflamatórios alérgicos, avaliamos o papel da Gal-1 em dois modelos experimentais de conjuntivite induzida por ovalbumina em camundongos e pelo composto 48/80 em ratos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral:

Analisar o efeito do tratamento farmacológico com a Gal-1 recombinante (rGal-1) nos olhos de roedores utilizando dois modelos experimentais de conjuntivite.

### 2.2. Objetivo Específicos:

Assim, os objetivos específicos desse trabalho foram:

- i) No modelo de conjuntivite alérgica (CA) induzida pela ovalbumina (OVA) em camundongos, avaliar o efeito e o mecanismo de ação da instilação ocular de rGal-1, por meio de:
  - dosagem da imunoglobulina E (IgE) anti-OVA e IL-10 no plasma dos animais com CA;
  - análise quantitativa de leucócitos circulantes;
  - análise histopatológica e quantificação de células inflamatórias na conjuntiva palpebral;
  - dosagem de IFN- $\gamma$  nos homogeneizados dos olhos dos animais.
  
- ii) No modelo de conjuntivite induzida pelo composto 48/80 em ratos, avaliar o efeito e o mecanismo de ação da instilação ocular da rGal-1, por meio de:
  - escore clínico dos olhos após 20 minutos da instilação do composto 48/80;

- análise histopatológica e quantificação de eosinófilos e mastócitos nas conjuntivas palpebrais;
- dosagem de histamina nos homogeneizados dos olhos dos animais;
- dosagem de citocinas e quimiocinas por painel mutiplex no fluido lacrimal e nos homogeinizados dos olhos;
- expressão da peroxidase eosinofílica (EPX) e das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) nos homogeinizados dos olhos.





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem Balb/c, pesando entre 20-25g, foram obtidos no CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia) da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, com seis a oito semanas de vida. Os animais foram mantidos no Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP.

Ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 200-250g, com oito a dez semanas de vida, foram obtidos no Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto, SP. Os animais foram mantidos no Laboratório de Imunomorfologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

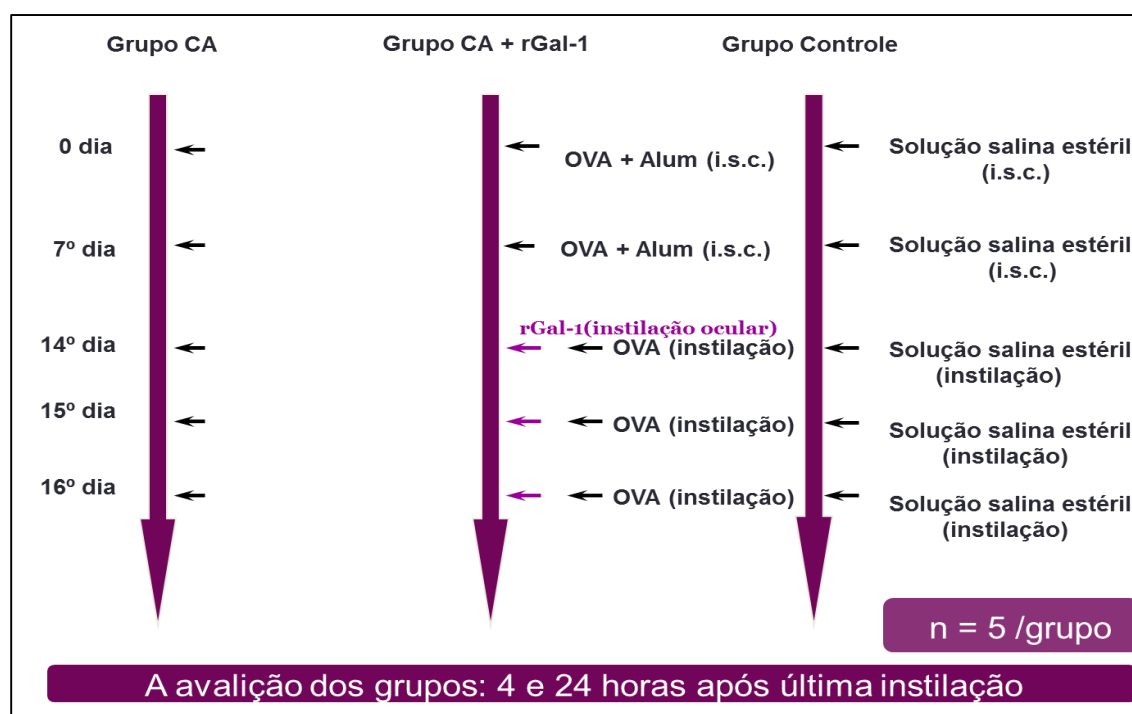
Todos animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura (22 a 25°C) e luminosidade controladas (ciclo de 12h claro/escuro), recebendo água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFESP (CEUA n°7611050814) e do IBILCE/UNESP (CEUA n°092/2014).

#### 3.2. Modelo Experimental de Conjuntivite Alérgica Induzido por OVA em Camundongos

Os camundongos Balb/c foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n=5/grupo), imunizados nos dias 0 e 7 via subcutânea com 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 (MELLO et al., 2015) (Figura 6). Nos dias 14, 15 e 16, após anestesia via intraperitoneal (i.p.) com cloridrato de cetamina (100 mg/kg; Cetamin/Syntec) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg; Xilazin/Syntec), os animais receberam instilação direta no saco conjuntival de 250 µg de OVA em 10 µl de salina/ olho em ambos olhos. Parte dos camundongos sensibilizados foram pré-tratados por instilação direta no saco conjuntival nos dias 14, 15 e 16 com a proteína Gal-1 recombinante (rGal-1; Peprotech, EC Ltd, London, UK) na concentração de 0,3 µg por animal ( GIL et al., 2006a ; MELLO et al., 2015), diluída em 10 µl de salina estéril, respectivamente, 15

minutos antes da instilação de OVA. Os animais controles receberam apenas salina estéril.

Após 4 e 24h do último desafio com OVA, os animais foram anestesiados (cetamina e xilazina, 100 e 20 mg/Kg, i.p.), submetidos à punção cardíaca para obtenção de sangue em seringa previamente preparada com EDTA, para quantificação de leucócitos e dosagem de IgE anti-OVA e citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  por ELISA (item 3.3.2.). Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para coleta das conjuntivas palpebrais e olhos. A figura 6 mostra protocolo experimental de conjuntivite alérgica:



**Figura 6.** Protocolo experimental para indução da CA em camundongos. Cada grupo experimental foi constituído por cinco animais.

### 3.2.1. Quantificação de leucócitos no sangue

Após coleta do sangue com anticoagulante EDTA, 10  $\mu$ l de cada amostra foram diluídos na solução de Turk (0,1 g de violeta cristal diluído em 3% de ácido acético) na proporção de 1:20 para quantificação dos leucócitos (eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos) em câmara de *Neubauer*. Em seguida o sangue foi centrifugado a 600 x g para coleta do plasma, que foi congelado a -20°C para dosagem de IgE e citocinas (item 3.4). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.) do número de células x 10<sup>5</sup>/mL.

### 3.2.2. Dosagem de IgE anti-ovalbumina e citocinas

Os olhos foram macerados em nitrogênio líquido, transferidos para microtubos contendo coquetel completo de inibidores de proteases livre de EDTA e de inibidores de fosfatases (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), diluído em 500µL de solução tampão de lise (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM) e 1% de Triton-x, pH 7,4. Os microtubos foram mantidos no gelo por 15 minutos sob agitação constante, centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos, e os sobrenadantes armazenados a -80°C para utilização na ELISA.

Os níveis de IgE anti-ovalbumina e IL-10 foram avaliados no plasma, enquanto o IFN- $\gamma$  foi avaliado no macerado dos olhos pelo método de ELISA, por meio de kits de imunoenensaio específicos comercialmente disponíveis (IgE anti-OVA, Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA; citocinas, Peprotech, México, DF), seguindo as instruções do fabricante. Todas as estimações foram feitas em duplicata e os resultados demonstrados como média  $\pm$  S.E.M. de proteína (ng/mL ou pg/mL).

### 3.3. Modelo Experimental de Conjuntivite induzida pelo composto 48/80 em ratos

Os ratos *Wistars* foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 6-10/grupo), como indicado na Tabela 1. A conjuntivite experimental foi induzida no grupo I pela instilação no saco conjuntival do olho direito de 20 µL do composto 48/80 (100 mg/mL- *Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA*) diluído em PBS (TILIGADA et al., 2000; PAPATHANASSIOU et al., 2011). Como controle, o olho contralateral (esquerdo) foi instilado apenas com PBS. Os grupos II e III receberam pré-tratamento farmacológico com a proteína recombinante Gal-1 (rGal-1) nas concentrações 0,3 e 3 µg/olho (GIL et al., 2006a; MELLO et al., 2015), respectivamente, e após 10 minutos, foi instilado o composto 48/80 ou PBS (controle). O grupo IV recebeu instilação de 20µL do cromoglicato de sódio (40 mg/mL) (PAPATHANASSIOU et al., 2011), um estabilizador da membrana de mastócitos, e, após 10 minutos, o composto 48/80 ou PBS (controle). Após 20 minutos, o escore clínico foi avaliado (item 3.3.1). Seis horas após a última instilação do C48/80, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com quetamina (100 mg/kg; *Ketalar/Parke-Daves*) e xilazina (20 mg/kg; *Rompum/Bayer*), para coleta do fluido

lacrimal, pálpebras e olhos, e posteriormente eutanasiados por dose excessiva de anestésico.

**Tabela 1.** Protocolo experimental para indução da conjuntivite induzida pelo composto 48/80 em ratos.

Grupo	Olho Direito (Experimental)	Olho Esquerdo (Controle)
I	C48/80 (100 mg/mL)	PBS
II	rGal-1 (0,3µg/olho) + C48/80 (100mg/mL)	rGal-1 (0,3µg/olho) + PBS
III	rGal-1 (3µg/olho) + C48/80 (100mg/mL)	rGal-1 (3µg/olho) + PBS
IV	Cromoglicato de sódio (40 mg/mL) + C48/80 (100mg/mL)	Cromoglicato de sódio (40mg/mL) + PBS

\*Cada grupo experimental foi constituído de 6-10 animais.

### 3.3.1. Escore clínico

O escore clínico foi avaliado após 20 minutos da instilação ocular do composto 48/80 nos ratos. A avaliação de ocorrência ou não da conjuntivite foi realizada pela observação de quatro sinais clínicos: edema de conjuntiva, hiperemia de conjuntiva, edema de pálpebra e lacrimejamento. Essa avaliação seguiu uma graduação de zero a três cruces para cada sinal, adaptando-se uma tabela de escore (Tabela 1) (MAGONE et al.,1998). Nesse aspecto, cada animal recebeu um escore clínico total de zero a doze cruces, proporcionalmente à intensidade da conjuntivite.

**Tabela 2.** Avaliação clínica da conjuntivite alérgica

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

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

### 3.3.2 Análise dos Níveis de Histamina

Para a análise dos níveis de histamina, os olhos foram macerados com auxílio de um homogeneizador (*Uniscience*, São Paulo, Brasil) em microtubos contendo coquetéis completos de inibidores de proteases livre de EDTA (*Roche Applied Science, Mannheim, Germany*) e de inibidores de fosfatases (*Roche Applied Science, Mannheim, Germany*), diluídos em 500  $\mu$ L de solução tampão de *lise* (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM) e 1% de Triton-x, pH 7,4. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos, e os sobrenadantes armazenados a -80°C.

Para a dosagem de histamina, 100  $\mu$ l de cada amostra foi utilizado para realização da técnica de ELISA com kit de imunoenensaio específico (*MyBioSource*, San Diego, CA, USA) e seguindo as instruções do fabricante. Todas as estimativas foram realizadas em duplicata e os resultados demonstrados como média  $\pm$  S.E.M. da concentração de histamina (nM).

### 3.3.3. Análises de Quimiocinas e Citocinas por Painel Multiplex

Para análise de quimiocinas e citocinas nos olhos e no fluido lacrimal dos animais nas diferentes condições experimentais, utilizamos o painel multiplex *RECYTMAG-65K* (*Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA*) e o equipamento *LUMINEX xMAPMAGPIX* (*Millipore Corporation, USA*), capaz de detectar múltiplos analitos com rapidez e especificidade, por meio de *beads* magnéticas, no Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP.

Seis analitos foram estudados: as citocinas IL-4, -6, -10, IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) no macerado dos olhos, e eotaxina e RANTES no fluido lacrimal (Regulada sob Ativação, Expressa e Secretada por Células T Normais). 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/quimiocinas em pg/mL.

Para realização das dosagens, o fluido lacrimal foi coletado por meio de instilação direta de 10  $\mu$ l solução salina no saco conjuntival por duas vezes em cada olho, obtendo-se um *pool* de 40 $\mu$ l/animal, e ambos congelados a - 80°C. Os olhos foram processados como descrito no item 3.3.2. Para a realização do ensaio multiplex, as *beads* magnéticas, soluções controles, padrões e tampão de lavagem foram

preparados e homogeneizados conforme as instruções do fabricante. Inicialmente, foram adicionados 25  $\mu$ L dos padrões, soluções controle e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada previamente com o tampão de lavagem. Em seguida, 25  $\mu$ L de *assay buffer* foi adicionado às amostras e aos padrões e, 25  $\mu$ L de *beads* magnéticas revestidas com anticorpos específicos (Millipore Corporation, USA) 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 200  $\mu$ L de tampão de lavagem e, incubada com 25  $\mu$ L de anticorpo de detecção ligado a biotina à temperatura ambiente, por 1h sob agitação. Para completar a reação, 25  $\mu$ L de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada nos poços para incubação por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, a placa foi lavada duas vezes, incubada com 150  $\mu$ L de fluido específico do equipamento (*Drive Fluid*) por cinco minutos para, em seguida, realizamos a dosagem dos analitos no LUMINEX xMAP MAGPIX.

#### 3.3.4. Western Blotting

Para a análise dos níveis da peroxidase eosinofílica (EPX) e das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), os olhos foram processados e congelados como descrito no item 3.3.2.

As alíquotas das 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 (olhos macerados) por grupo (n=3/grupo). Os *pools* (30  $\mu$ g de proteína) e os marcadores de peso molecular (*Bio-RadLife Science*, USA) foram separados em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio-gel de poliacrilamida a 12%) e, posteriormente, transferidos para membrana de nitrocelulose. Para verificar a eficácia da transferência das proteínas, as membranas foram coradas com *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 3.

**Tabela 3.** Anticorpos primários policlonais

Anticorpo	Diluição	Fabricante
<i>Mouse anti-p-ERK</i>	1:5000	<i>CellSignaling</i> , Danvers, MA, EUA
<i>Mouse anti-p-JNK</i>	1:2000	
<i>Mouse anti-p-p38</i>	1:2000	
<i>Goat anti-EPX</i> (Peroxidase eosinofílica)	1:200	Santa Cruz <i>Biotechnology</i> , CA, EUA
<i>Rabbit anti-GAPDH</i> (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	1:5000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA

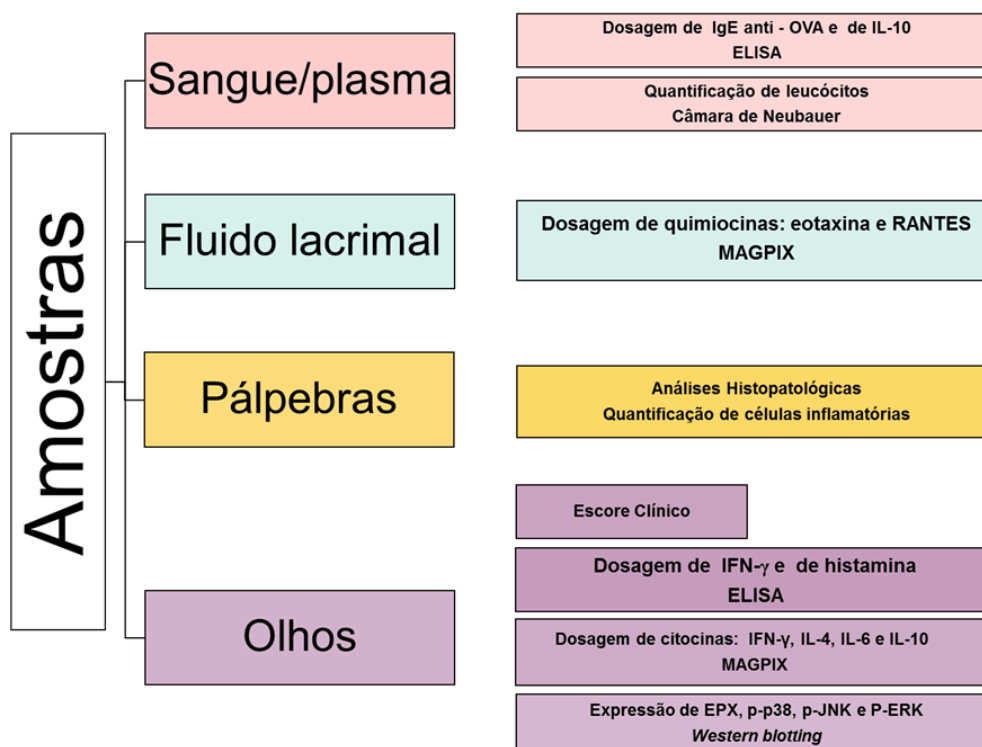
Todos os anticorpos foram diluídos em TBS-Tween 20 a 0,1 %, e incubados *overnight* a 4°C. Após lavagem por 15 minutos em TBS, as membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 60 minutos com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase *goat anti-rabbit IgG*, *rabbit anti-goat* (1:2000; Thermo 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.).

### 3.4. Fixação, processamento e inclusão para a microscopia de luz

As pálpebras de camundongos e ratos foram fixadas em formol tamponado a 10%, por 24h. Após, as amostras foram lavadas em água corrente, desidratadas em uma série crescente de etanol e, incluídas em parafina. Cortes de 4 µm foram obtidos no micrótomo Leica RM2155, desparafinizados e corados pela hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica e quantificação de 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, AXIOSKOP 2, do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP. As áreas de cada tecido forão obtidas com o auxílio do *software* analisador de imagem Axiovision 4.8 (ZEISS). Os valores foram demonstrados como média ± S.E.M. do número de células por mm<sup>2</sup> de três cortes semi-seriados, com distância de 12 µm entre cada secção.

O esquema abaixo ilustra as diferentes metodologias que foram utilizadas nesse estudo para análise das amostras coletadas nos dois modelos de conjuntivite.



**Figura 7.** Esquema de processamento das amostras nos dois modelos de conjuntivite em roedores.

### 3.5. Análises Estatísticas

Todos 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.





## 4. RESULTADOS

### 4.1. Manuscrito Submetido

#### Clinical and Experimental Ophthalmology

##### **Treatment with galectin-1 eye drops regulates mast cell degranulation and attenuates the severity of conjunctivitis**

Claudia Bosnic Mello MSc, <sup>1</sup> Tamires Barbosa Lucena da Rocha BNurs, <sup>2</sup> Alexandre Dantas Gimenes MSc, <sup>2</sup> Sonia Maria Oliani PhD, <sup>1</sup> and Cristiane Damas Gil PhD <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> UNESP – Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Biociências, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto-SP, Brasil.

<sup>2</sup> UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Morfologia e Genética, São Paulo-SP, Brasil.

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, Brasil, Telephone: +55 11 5576-4268, E-mail: cristiane.gil@unifesp.br

Short running title: Galectin-1 regulates mast cell degranulation

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

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

**ABSTRACT**

**Background:** Galectin-1 is a  $\beta$ -galactoside-binding protein with diverse biological activities in the pathogenesis of inflammation, but its role in allergy is uncertain. Here, we evaluated the effect of recombinant galectin-1 (rGal-1) eye drops in two rodent models of conjunctivitis.

**Methods:** Ovalbumin (OVA)/alum-immunized BALB/c mice (days 0 and 7) were challenged with eye drops containing OVA (250  $\mu$ g) on days 14-16 and two groups received ocular pharmacological treatment with rGal-1 (0.3  $\mu$ g) on the challenge days. In a second set of experiments, rGal-1 (0.3 or 3  $\mu$ g) and sodium cromoglycate (SCG) were instilled in control and compound 48/80-challenged eyes of Wistar rats.

**Results:** Compared to the untreated group, rGal-1 eye drops attenuated mouse OVA-induced allergic conjunctivitis via up- and downregulation of IL-10 and IFN- $\gamma$  levels, respectively. Furthermore, rGal-1 diminished leukocyte influx to the palpebral conjunctiva and mast cell degranulation. C48/80 administration induced conjunctivitis characterized by severe eyelid oedema and tearing, but clinical signs were ameliorated by eye drop doses of both rGal-1 (0.3/3 $\mu$ g) and SCG. As expected, an increased proportion of degranulated mast cells (62%,  $P < 0.01$ ) and lower histamine levels were observed after C48/80 challenge, compared to control (32%). This effect was abrogated by rGal-1 and SCG, which reduced mast cell degranulation (31-36%), eosinophil migration and eosinophil peroxidase levels in the eyes. rGal-1 (3  $\mu$ g) and SCG treatments also decreased IL-4 levels, as well as activation of mitogen activated protein kinases compared to untreated C48/80 eyes.

**Conclusions:** rGal-1 eye drops represent a new therapeutic strategy for ocular allergic inflammation.

**Key words:** compound 48/80, eosinophil, mitogen-activated protein kinases, inflammation, ovalbumin.

## INTRODUCTION

Pharmacological treatment of ocular inflammatory processes, especially allergic conjunctivitis (AC), includes antihistamines, mast cell membrane stabilizers, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids. The latter is used in the more severe AC and has higher risk of adverse effects, such as increased intraocular pressure and cataracts. <sup>1</sup> Therefore, the investigation of new pharmacological agents that are more effective in controlling the inflammatory response with fewer adverse effects, is fundamental. We highlight galectin-1 (Gal-1), a 14.5 kDa  $\beta$ -galactoside-binding protein that regulates the inflammatory process, as a potential anti-inflammatory agent. <sup>2</sup>

Gal-1 belongs to a family of proteins that share a highly-conserved carbohydrate-recognition domain (CRD) that is responsible for their high affinity for  $\beta$ -galactosides in glycoconjugates. <sup>3</sup> Gal-1 expression has been detected in several cells related to the inflammatory response, especially neutrophils, mast cells, macrophages, lymphocytes and endothelial cells, suggesting an important role in the generation and maintenance of immunological tolerance. <sup>4-9</sup>

The anti-inflammatory role of Gal-1 has been demonstrated in *in vitro* and *in vivo* experimental models after exogenous administration of recombinant Gal-1 (rGal-1). *In vitro*, incubation with rGal-1 inhibited the migration of human neutrophils and lymphocytes through endothelial cells after inflammatory stimulation with interleukin (IL)-8 or tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), respectively. <sup>7,10</sup> *In vivo*, pharmacological treatment with rGa-1 regulates the inflammatory response by inhibiting leukocyte transmigration and release of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and IL-12. <sup>7,8,11-15</sup> Previously, we demonstrated the inhibitory effect of rGal-1 in an experimental model of ovalbumin (OVA)-induced AC in mice, on the production of Th2 cytokines (IL-4, IL-13) and eotaxin by lymph nodes. This was associated with decreased clinical disease signs and production of anti-OVA IgE. <sup>16</sup> However, the mechanisms by which Gal-1 modulates cellular responses in allergic inflammatory processes have not been fully determined, particularly in ocular models.

In view of these considerations and the need for safer therapies for the treatment of conjunctivitis and other allergic inflammatory processes,<sup>1,17</sup> we evaluate the effect of treatment with rGal-1 eye drops in two rodent models of conjunctivitis.

## **METHODS**

### **Animals**

Male BALB/c mice and Wistar rats, weighing 20-25 g and 200-250 g, respectively, were housed in a 12 h light-dark cycle and were allowed food and water *ad libitum*. All experimental procedures were submitted to and approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of São Paulo - UNIFESP (CEUA 7611050814) and São Paulo State University (CEUA 092/2014).

### **Experimental Models and Treatment Protocols**

#### **Ovalbumin (OVA)-Induced AC**

BALB/c mice were immunised with a subcutaneous injection of 5 µg of OVA (grade V) and 15 mg/ml of aluminium hydroxide adjuvant diluted in 200 µl of sterile saline on days 0 and 7, consistent with previous reports.<sup>16</sup> On days 14, 15 and 16 after an intraperitoneal (i.p.) injection of anaesthesia with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg), mice received a direct instillation of 250 µg of OVA in 10 µl of sterile saline onto the conjunctival sac. SHAM animals received sterile saline alone. To determine the therapeutic efficacy of the exogenously administered Gal-1 in this model, sensitised mice were pretreated on days 14, 15 and 16 with an ocular instillation of rGal-1 protein (0.3 µg/animal) (Peprotech, EC Ltd, London, UK), diluted in 10 µl of sterile saline 15 minutes before the OVA instillation. At 4 and 24 hours after the final OVA challenge, mice were anaesthetised to obtain blood through cardiac puncture using a syringe containing 10% EDTA, for the analysis of anti-OVA IgE and IL-10 levels and leukocyte quantification. The animals were then euthanized and the eyes and eyelids were collected for the analysis of INF-γ levels and histopathology/inflammatory cell quantification, respectively.

### Compound 48/80-Induced Conjunctivitis

Wistar rats were distributed into groups of 7-10 animals per treatment, as indicated in Table 1. Experimental conjunctivitis was induced in group I by a topical application of a single 20  $\mu$ l drop of mast cell secretagogue compound 48/80 (C48/80) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) at 100 mg/ml, <sup>18,19</sup> diluted in PBS, onto the conjunctival sac. As a control, the contralateral eye (left) received only PBS. Groups II, III and IV were administered with a 20  $\mu$ l topical drop of 0.3 and 3  $\mu$ g/eye of rGal-1 or 40 mg/ml of mast cell stabilizer sodium cromoglycate (SCG), respectively, and after 10 minutes, C48/80 (experimental groups) or PBS (control groups). Doses of C48/80, rGal-1 and SCG were scaled up from previous studies. <sup>16,19</sup> All drug instillations on rat conjunctival sacs were performed in animals anaesthetised with ketamine and xylazine.

**Table 1.** Experimental conjunctivitis induced in rats and respective treatments.

Groups	Right eye (Experimental)	Left eye (Control)
I	C48/80 (100 mg/ml)	PBS
II	rGal-1 (0.3 $\mu$ g/eye) + C48/80 (100 mg/ml)	rGal-1 (0.3 $\mu$ g/eye) + PBS
III	rGal-1 (3 $\mu$ g/eye) + C48/80 (100 mg/ml)	rGal-1 (3 $\mu$ g/eye) + PBS
IV	SC (40 mg/ml) + C48/80 (100 mg/ml)	SC (40 mg/ml) + PBS

A single 20  $\mu$ l drop of each agent was instilled into the lower conjunctival fornix of one eye, at 10 min intervals. The contralateral eye was used as the respective control (n = 4–7). C48/80, compound 48/80; rGal-1, recombinant Gal-1; SC, sodium cromoglycate; PBS, phosphate-buffered saline.

After 20 minutes of C48/80 challenge, rats were clinically examined to verify the occurrence and severity of conjunctivitis. Four clinical signs were observed: chemosis, conjunctival hyperaemia, lid oedema and tearing. Scoring similar to that described by Magone et al. <sup>20</sup> was performed and each parameter was graded on a scale ranging from 0 to 3+ (0 = absence; 1 = mild; 2 = moderate and 3 = severe symptoms). Thus, each animal received a total clinical score ranging from 0 to 12+, and the data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for each group. Six hours after the last C48/80 challenge, lacrimal fluid was collected by direct instillation of 20  $\mu$ l of sterile saline into the conjunctival sac of each eye, providing a pool of 40  $\mu$ l/animal, for the analysis of chemokine levels. The

animals were then euthanized and the eyes and eyelids were collected for the analysis of histamine and Th1/Th2 cytokine levels, inflammatory cell quantification and Western blotting.

### **Blood Leukocyte Quantification**

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

### **ELISA**

Whole mouse blood was centrifuged at  $600 \times g$  for 10 minutes to collect the plasma and determine the IgE anti-OVA and IL-10 levels by standard ELISA kit as described by the manufacturer. IFN- $\gamma$  and histamine levels were determined in eyes from mice and rats, respectively, subjected to different experimental conditions. Eye samples were sonicated in a 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1% Triton-X, pH 7.4 buffer containing complete protease inhibitor cocktail and PhosSTOP tablets (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Subsequently, samples were centrifuged at  $10,000 \times g$  for 20 minutes at 4°C to obtain organ supernatants. IgE anti-OVA ELISA kits were purchased from Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA. IL-10 and IFN- $\gamma$  kits were purchased from Peprotech, Mexico City, Mexico. The histamine kit was purchased from MyBioSource, San Diego, CA, USA. All estimations were made in duplicate and the data expressed as the mean  $\pm$  SEM of protein (pg/ml or nM).

### **Multiplex Analysis**

Rat lacrimal fluid and eye homogenates were tested using the MILLIPLEX MAP rat cytokine/chemokine panel (RECYTMAG-65K; Millipore Corporation, USA) and MAGPIX® Multiplexing Instrument (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Eotaxin and RANTES (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and presumably Secreted) were evaluated in the lacrimal fluid and, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  in the eye homogenates. The concentration of analytes was

determined by MAGPIX Xponent software (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). All estimates were made in duplicate and the results shown as mean  $\pm$  SEM of protein (pg/ml).

### **Western Blot Analysis**

Protein levels of rat eye homogenates were determined by Bradford assay and normalized prior to boiling in Laemmli buffer (Bio-Rad Laboratories, USA). Pooled protein extracts (30  $\mu$ g per lane) of eyes (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 here: mouse monoclonal anti-phosphorylated (p)-ERK 1/2 (sc-16981), anti-p-JNK (sc-6254), anti-p-p38 (sc-17852), goat polyclonal anti-eosinophil peroxidase (EPX; sc-19148) (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-GAPDH (G9545) (1:5000) (Sigma-Aldrich), all diluted in TBS with 0.1% Tween 20. Post-incubation with primary antibodies, 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 rabbit anti-goat IgG, goat anti-rabbit (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 GeneTools software (SynGene) to determine the relative expression of indicated proteins (arbitrary units, a.u.).

### **Histopathology and Quantification of Inflammatory Cells**

Palpebral conjunctiva from mice and rats were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, washed in tap water, dehydrated in an increasing ethanol series, and embedded in paraffin. Sections of 4  $\mu$ 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. Leukocytes 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 conjunctivas were analysed per animal and the area was determined using AxioVision software (Carl Zeiss). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM cells per mm<sup>2</sup>.

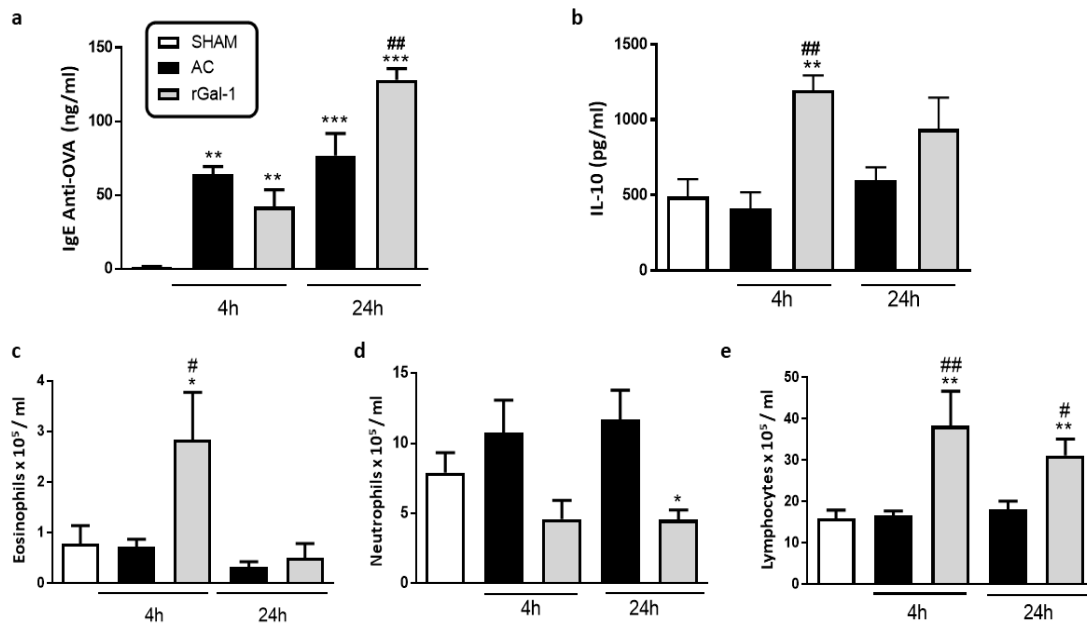
### Statistical Analysis

The data were analysed using one-way ANOVA followed by Bonferroni *t*-tests between corresponding time points using GraphPad Prism 4.0 software. Non-parametric analysis of the scores assigned to the conjunctival symptoms was performed using the Mann-Whitney test. In all cases, a probability value < 0.05 was considered significant.

## RESULTS

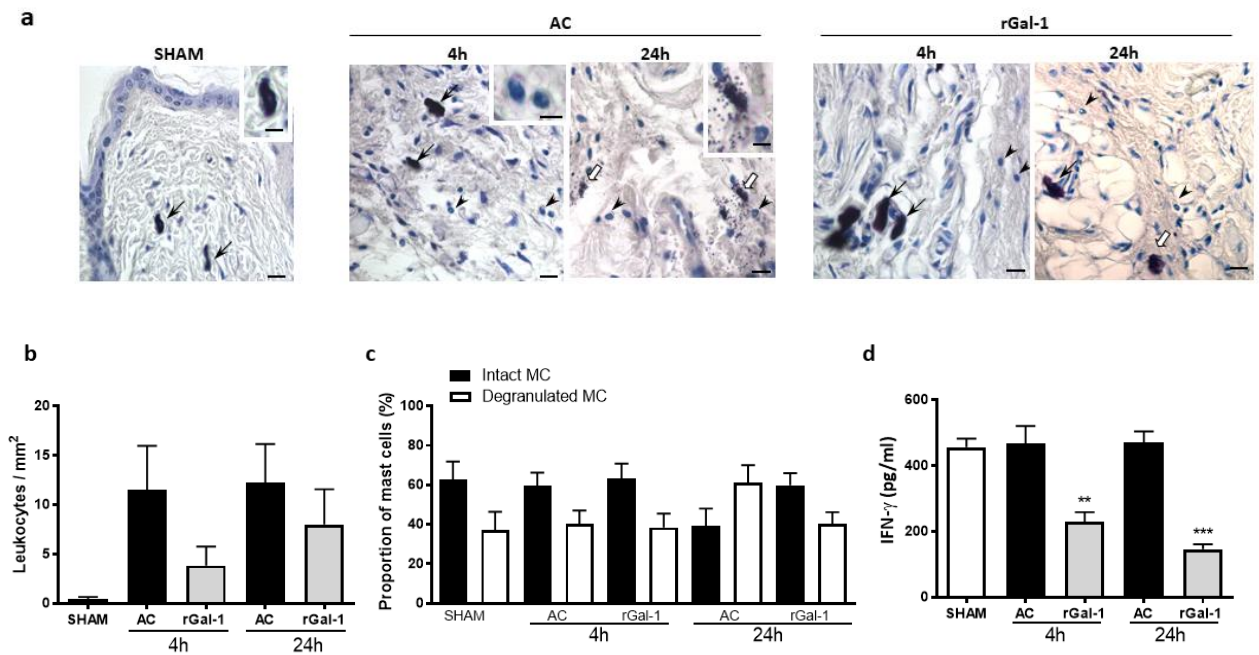
### rGal-1 Eye Drops Reduce OVA-Induced Inflammatory Responses in an AC Mouse Model

Previous studies from our group showed that systemic treatment with 0.3  $\mu$ g of rGal-1 on OVA-induced AC mice diminished clinical scores and inflammatory markers of the allergic response.<sup>16</sup> In the first step of this study we evaluated the effect of ocular instillation with 0.3  $\mu$ g of rGal-1 at 4 and 24 hours after the final OVA challenge. AC mice treated or not with rGal-1 presented significantly increased plasma anti-OVA IgE levels compared to the control group (SHAM) (Fig. 1a). In the initial phase of the allergic response (4h), pharmacological treatment with rGal-1 significantly increased the anti-inflammatory plasma IL-10 levels in relation to the SHAM and AC groups, an effect maintained in the late phase (24 h) (Fig. 1b). In addition, animals treated with rGal-1 demonstrated blood eosinophilia and lymphocytosis while decreased numbers of neutrophils were detected compared to the untreated AC groups (Fig. 1c-e).



**Figure 1.** Effect of rGal-1 eye drops on systemic response to OVA-induced allergic conjunctivitis. (a) Plasma IgE anti-OVA levels. (b) Plasma IL-10 levels. (c-e) Blood eosinophil, neutrophil and lymphocyte quantification. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the IgE (ng/ml), IL-10 (pg/ml) or leukocytes  $\times 10^5$ /ml ( $n = 5$ /group). SHAM, control group. AC, allergic conjunctivitis. rGal-1, AC treated with rGal-1 drop eyes. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. SHAM; # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$  vs. AC.

Histologically, AC was characterized by intense polymorphonuclear leukocyte influx compared to SHAM, which was mitigated by rGal-1 eye drops (Fig. 2a, b). Mast cell analysis revealed a higher percentage of degranulated cells after 24 h of AC induction (61%) compared to the SHAM group (37%). This effect was reversed by rGal-1 treatment, which showed a higher proportion of intact cells (60%) (Fig. 2a, c). Additionally, rGal-1 induced a marked reduction in IFN- $\gamma$  levels in the eye homogenates relative to the untreated AC groups (Fig. 2d).

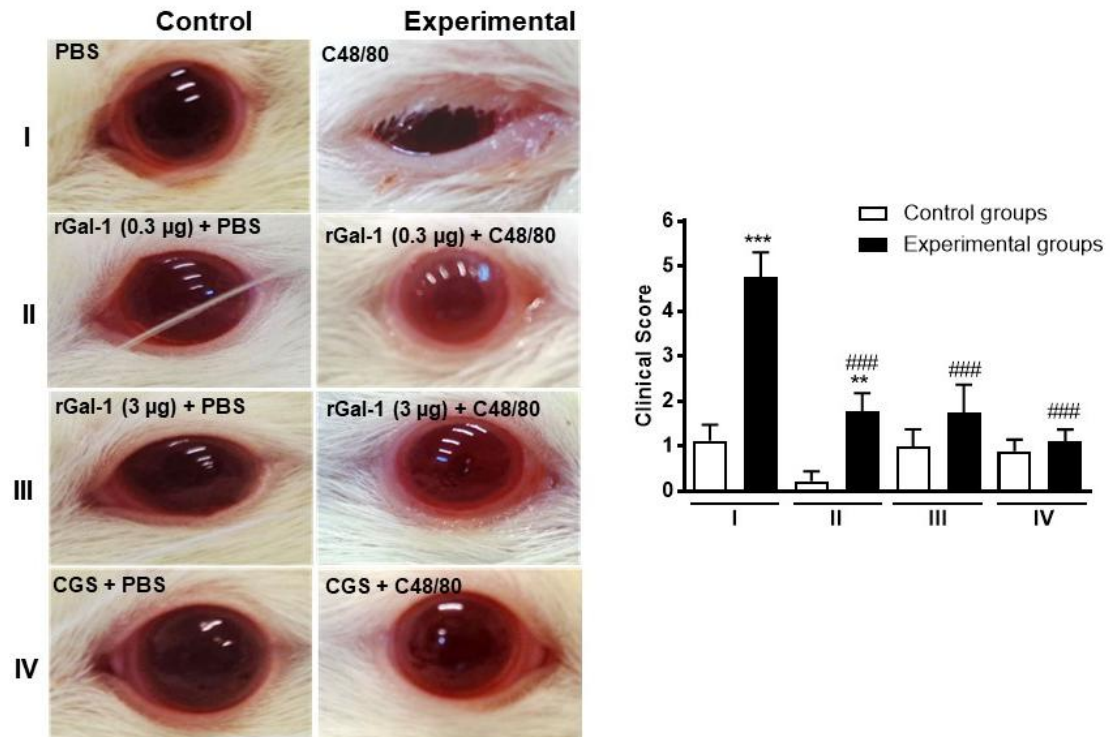


**Figure 2.** Effect of rGal-1 eye drops on local response to OVA-induced AC. (a) Intact (black arrows) and degranulated mast cells (white arrows) observed in the control - SHAM, AC (allergic conjunctivitis) and Gal-1 (AC treated with rGal-1 eye drops) groups at 4 and 24 h. Leukocyte influx (arrowheads) was detected in the AC groups, treated or untreated rGal-1, showing an inflammatory process. Insets: details of intact and degranulated mast cells, and polymorphonuclear leukocytes. Stain: Toluidine blue. Bars: 20  $\mu\text{m}$ ; 10  $\mu\text{m}$  (insets). (b) Quantitative analysis of leukocytes. (c) Proportion of intact and degranulated mast cells in the palpebral conjunctiva. (d) Eye IFN- $\gamma$  levels. Data represent the mean  $\pm$  SEM of the cell numbers analysed per  $\text{mm}^2$  or cytokine (pg/ml) ( $n = 5/\text{group}$ ). \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs. SHAM.

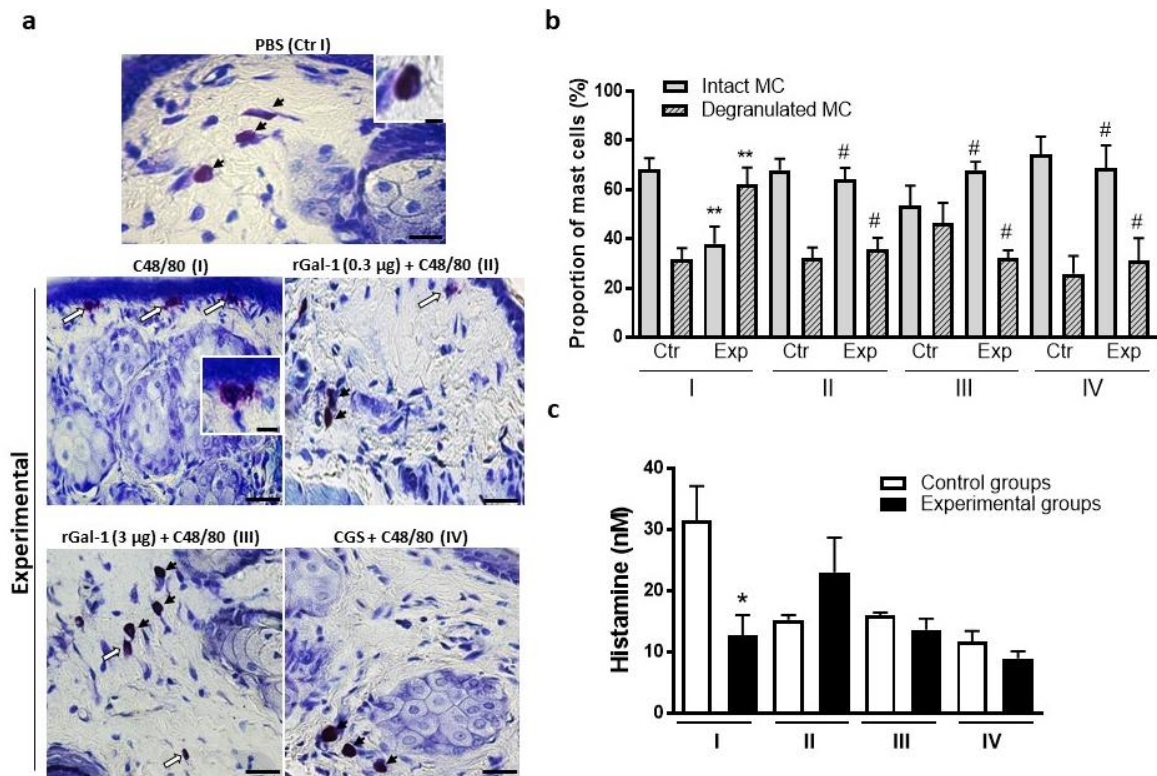
### Topical rGal-1 Eye Drops Regulate C48/80-Induced Mast Cell Activation in Rats

To verify whether the anti-inflammatory effect of rGal-1 on the conjunctiva was directly related to mast cells, our next step was to evaluate the action of rGal-1 in a C48/80-induced conjunctivitis model. The administration of C48/80 in rat eyes induced an inflammatory response characterized by conjunctival hyperaemia and intense eyelid and conjunctiva oedema, which was abrogated by rGal-1 and SCG treatments (Fig. 3a). The score confirmed the macroscopic observations, showing a significant decrease in the clinical signs in the eyes treated with rGal-1 and SCG compared to the untreated C48/80 rats (Fig. 3). No alterations were detected in the score data of the control groups.

To confirm the effect of C48/80 on mast cell activation, we performed a histological analysis of palpebral conjunctiva. Control and experimental groups presented mast cells with metachromatic cytoplasmic granules as determined by toluidine blue stain (Fig. 4a). No differences were detected in the total mast cell numbers between control and experimental groups (data not shown). However, challenge with C48/80 markedly increased the degranulated mast cell population (62%,  $P < 0.01$ ) compared to the respective control group (32%) (Fig. 3b, c). This effect was reversed by the application of rGal-1 (0.3  $\mu\text{g}$  and 3  $\mu\text{g}$ ) and SCG, which resulted in a decreased mast cell degranulation (~31-36%) and an increase in intact cells (Fig. 4a, b). Among the control groups I (PBS), II (0.3  $\mu\text{g}$  rGal-1), III (3  $\mu\text{g}$  rGal-1) and IV (SCG), there were no significant differences in the proportion of intact and degranulated cells. These findings were corroborated by the histamine levels in the eye homogenates (Fig. 4c). Administration of C48/80 (Exp. I) significantly decreased histamine levels in comparison to the control group I (Fig. 4c). In contrast, topical pre-treatment with rGal-1 and SCG reverted this effect and no differences were detected between experimental and control groups II-IV. Interestingly, eye homogenates from control groups II-IV (treated with rGal-1 or SCG only) displayed decreased levels of histamine in relation to control group I (PBS).



**Figure 3.** Clinical Score. Rat eyes observed 20 minutes after instillation of C48/80 (Experimental groups) or PBS (control groups). C48/80-challenged eyes (Experimental I) exhibited conjunctival hyperaemia and intense eyelid and conjunctiva oedema. The effect was mitigated by 0.3 and 3 µg of rGal-1 (Experimental II and III) and SCG (Experimental IV) eye drops. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of clinical scores (n = 7-10 animals/group). \*\*\* $P < 0.001$  vs. C48/80 group (Experimental I).



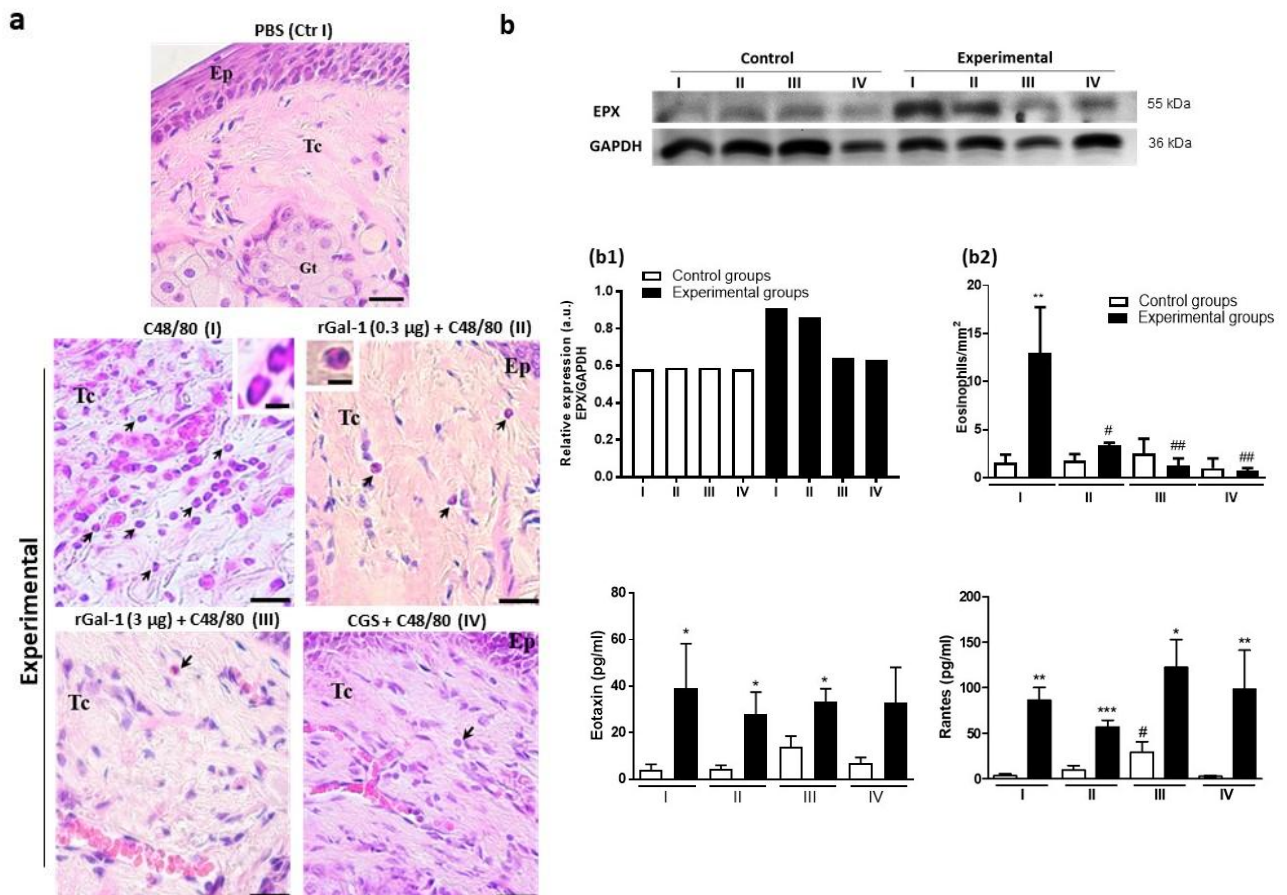
**Figure 4.** Effect of rGal-1 eye drops on C48/80-induced conjunctivitis rat model. (a) Intact mast cells (black arrows) with metachromatic cytoplasmic granules localized in the lamina propria of the control group. Degranulated mast cells (white arrows) detected in the experimental groups, especially in untreated C48/80 (Exp. I). Insets: detail of intact (control) and degranulated mast cells (Exp. I). C48/80 + rGal-1 0.3 µg (Exp. II); C48/80 + rGal-1 3 µg (Exp. III); C48/80 + SCG (Exp. IV). Stain: toluidine blue. Bars: 20 µm and 10 µm (insets). (b) Proportion of intact and degranulated mast cells in the palpebral conjunctiva. Data represent the mean ± S.E.M. of the cells (%) (n = 5 animals/group). \*\**P* < 0.01 vs. intact or degranulated MC (Ctr-I); #*P* < 0.05 vs. intact or degranulated MC (Exp. I). (c) Analysis of histamine levels in eyes. Data represent the mean ± SEM of the histamine concentration (nM) in the different groups (n = 5 animals/group). \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs. corresponding control groups; ###*P* < 0.001 vs. C48/80 (Exp. I).

**Topical Administration of rGal-1 Reduces Eosinophil Influx but not Chemokine Production**

The histological analysis of the eyelids of the C48/80-challenged eyes (Exp I) demonstrated an inflammatory response characterized by intense influx of eosinophils (Fig. 5a), which was abrogated by

rGal-1 and SCG eye drops (Exp. II-IV). Furthermore, increased levels of eosinophil peroxidase (EPX) were detected in the eye homogenates from C48/80-challenged animals (Exp. I) compared to the others experimental groups (Fig. 5b). Quantitative analysis of eosinophils in the palpebral conjunctiva confirmed the histological and western blot findings (Fig. 5b). The C48/80-challenged group (Exp. I) produced a marked increase of cells compared to the control (group I), while the rGal-1 and SCG pharmacological treatments were effective in decreasing the influx of eosinophils.

Despite rGal-1 and SCG having an anti-migratory effect on eosinophil influx, tear fluid from all experimental groups (I-IV) exhibited increased levels of eotaxin and RANTES compared to their respective control groups (Fig. 5c).



**Figure 5.** rGal-1 eye drops regulate eosinophil influx into the palpebral conjunctiva. (a) A marked influx of eosinophils (arrows) was detected in the palpebral conjunctiva 6 hours after C48/80 ocular instillation (Exp. I) compared to control, rGal-1- and SCG-treated groups (Exp. II-IV). Eyelids of the control group

I (PBS) exhibited conjunctiva with normal aspect. Stratified squamous epithelium (Ep). Loose connective tissue (Tc). Blood vessel (V). Tarsal gland (Gt). Insets: detail of the migrated eosinophils (Exp. I and II). Stain: haematoxylin-eosin. Bars: 20  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  (insets). (b) Expression of eosinophil peroxidase (EPX) in the eye homogenates. C48/80-challenged eyes (Exp. I) exhibited strong immunoreactivity for EXP (55 kDa) compared to the other groups. Immunoreactive bands were semiquantified by densitometry and expressed as arbitrary units relative to GAPDH (36 kDa; protein loading control) (b1). The data illustrate one representative example of two independent experiments. Quantification of eosinophils (b2). Data represent the mean  $\pm$  SEM of the number of cells per  $\text{mm}^2$  ( $n = 5$  animals/group).  $**P < 0.01$  vs. Control - Group I;  $\#P < 0.05$ ;  $\#\# P < 0.01$  vs. Experimental - Group I. (c) Eotaxin and RANTES levels in the tear fluid. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M of chemokine levels (pg/ml) ( $n = 7-10$  animals/groups).  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.1$ ;  $***P < 0.001$  vs. corresponding control groups;  $\#P < 0.05$  vs C48/80 (Exp. I).

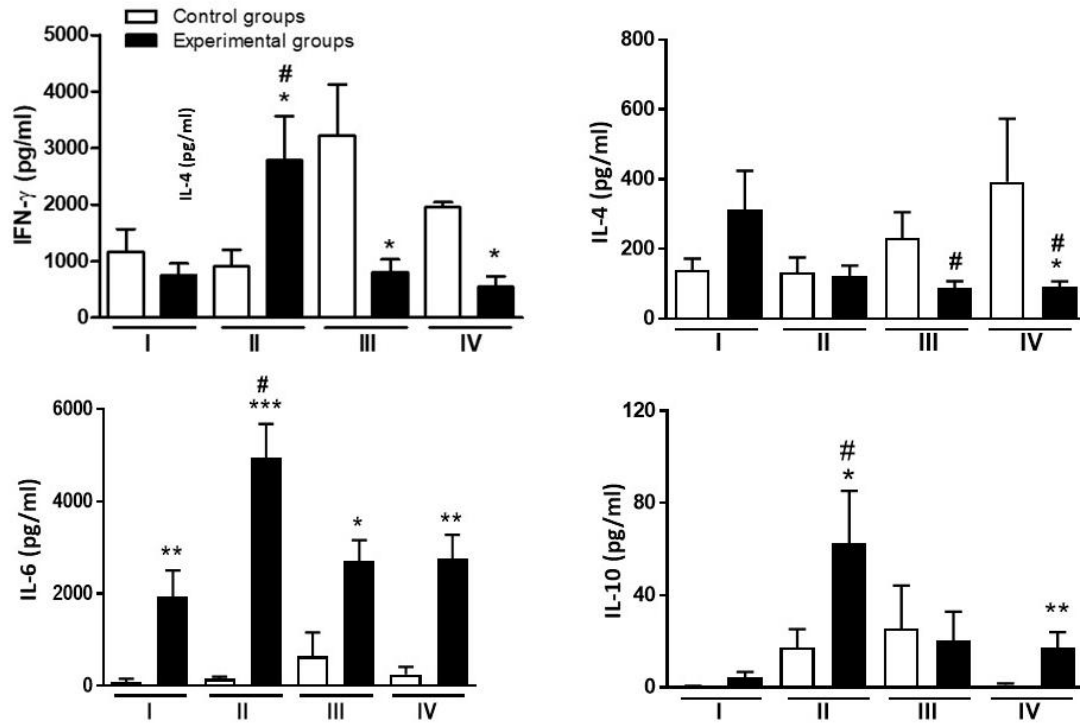
### **Effect of rGal-1 on Cytokine Production and Mitogen-Activated Protein kinase (MAPK) Activation in C48/80-Induced Conjunctivitis**

In order to verify the effect of the pharmacological treatments in the production of local cytokines we analysed eye homogenates from different experimental conditions. At the low concentration (0.3  $\mu\text{g}$  – Exp. II), rGal-1 plus C48/80 increased ocular levels of IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10 in relation to the respective control (II) and untreated C48/80 groups (Exp. I) (Fig. 6). Interestingly, high concentration rGal-1 (3  $\mu\text{g}$ ) and SCG (Exp. III and IV, respectively) decreased IFN- $\gamma$  and IL-4 levels (Fig. 6), confirming their local anti-inflammatory effects. All experimental groups (I-IV) showed a significant increase in IL-6 levels relative to the controls (Fig. 6).

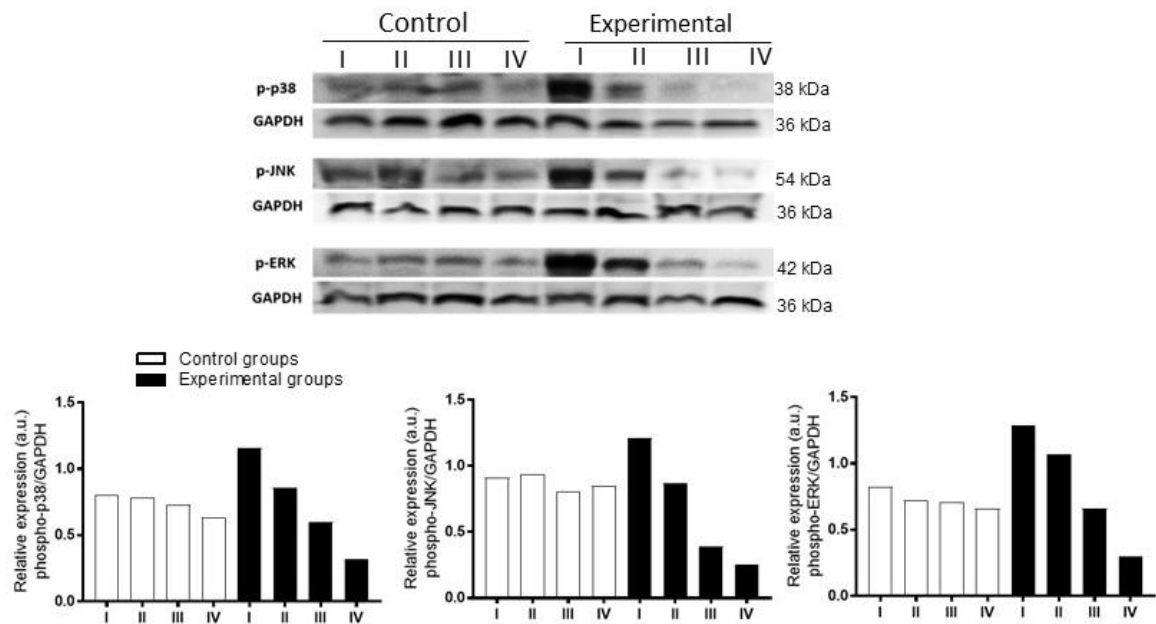
Considering that MAPKs (a well-conserved signalling pathway) have been implicated in inflammatory responses contributing to leukocyte recruitment and cytokine production,<sup>21</sup> we performed Western blot analysis to understand the downstream molecular signalling pathways involved in the effect of treatment with rGal-1 eye drops in conjunctivitis. The phosphorylation of ERK, JNK and p38 MAPKs was assessed in the pooled eye extracts ( $n = 3$  animals per group) from different experimental conditions.



C48/80-challenged eyes (Exp. I) exhibited increased levels of p-p38, p-JNK e p-ERK (Fig. 7) in relation to their respective control group I. Pharmacological treatments attenuated the C48/80 effect as evidenced by decreased expression of phosphorylated protein kinases, especially for rGal-1 at 3 µg and SCG. As expected, control groups I to IV demonstrated weak immunoreactivity for MAPKs.



**Figure 6.** Effect of rGal-1 eye drops on cytokine production. IFN-γ, IL-4, IL-6 and IL-10 levels in eye homogenates. Data represent the mean ± S.E.M of chemokine/cytokine levels (pg/ml) (n = 7-10 animals/groups). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.1; \*\*\**P* < 0.001 vs. corresponding control groups; #*P* < 0.05 vs. C48/80 (Exp. I).



**Figure 7.** Expression of MAPKs in eye homogenates. C48/80-challenged eyes (Exp. I) exhibited strong immunoreactivity for p-p38 (38 kDa), p-JNK (54 kDa) and p-ERK (42 kDa) compared to the other groups. Immunoreactive bands for MAPKs were semiquantified by densitometry and are expressed as arbitrary units of the ratio of p-MAPK/GAPDH (data illustrate one representative example of two independent experiments). GAPDH (36 kDa) was used as loading control.

## DISCUSSION

Here, we demonstrate that Gal-1 regulates the activation of mast cells and subsequent ocular inflammation through macroscopic, histological, biochemical and molecular analyses using two experimental models of conjunctivitis in rodents.

In previous studies, we demonstrated that systemic rGal-1 administration could negatively modulate the clinical signs in an AC model, including Th2 (IL-4 and IL-13), eotaxin/RANTES levels and MAPK-signalling.<sup>16</sup> Here, using the same model of type I hypersensitivity response induced by OVA, we demonstrate that rGal-1 eye drops can also regulate ocular inflammation, evidenced by increased levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and decreased IFN- $\gamma$ , as previously described.<sup>11-13,22</sup> In fact, the positive modulation of IL-10 is relevant in allergic conjunctivitis model, as this cytokine is a known

regulator of mast cell degranulation.<sup>23</sup> In addition, IFN- $\gamma$ -deficient mice show a significant reduction in the clinical signs of conjunctivitis, asthma and the influx of leukocytes to tissues compared to wild-type animals.<sup>24</sup> *In vitro* assays have also shown that IFN- $\gamma$  is able to activate mast cells, previously sensitized with IgE antibodies, inducing the release of histamine, IL-6 and IL-13 after 1 or 24 hours of challenge with specific antigens.<sup>24</sup>

In this regard, palpebral conjunctivae histology demonstrated the anti-inflammatory role of rGal-1 eye drops, showing a reduction in the proportion of degranulated mast cells (40%) compared to the untreated AC group (61%) after 24 hour of last OVA challenge. The effect of rGal-1 was also associated with a decreased influx of leukocytes to the palpebral conjunctivae. In contrast, blood eosinophilia and lymphocytosis were detected after rGal-1 eye drop treatment, which can be associated with its' inhibitory effect on the transmigration process of both cell types.<sup>10,25</sup> Thus, in the AC mouse model, rGal-1 eye drops are associated with the reduction of mast cell activation and, consequently, in ocular allergy regulation.

Prompted by these findings, we used a rat experimental model of conjunctivitis induced by mast cell secretagogue C48/80 to confirm the effect of rGal-1 on mast cell activation. The efficacy of our experimental model was confirmed by the clinical scores after 20 minutes of C48/80 ocular instillation. As expected, eyelid oedema, conjunctiva and tearing were associated with a significant increase in the proportion of degranulated mast cells in the palpebral conjunctiva treated with C48/80 compared to the control group. Furthermore, a marked decrease of histamine in eye homogenates after 6 hours of C48/80 challenge, confirmed the rapid activation of mast cells and release of their pre-stocked mediators. Consistently, other studies using this C48/80-induced conjunctivitis model detected a decrease in histamine levels in conjunctiva homogenates after 45 min, 1, 12 and 24 hours.<sup>18,19,26</sup>

In our study, we detected an intense influx of eosinophils in the rat palpebral conjunctiva after C48/80 challenge, which was corroborated by the intense immunoreactivity of EPX in the eye homogenates. The importance of mast cells in the induction of neutrophil and eosinophil transmigration has been

demonstrated in models of acute,<sup>27</sup> systemic<sup>28</sup> and allergic inflammation.<sup>29,30</sup> Two of these studies, using selective depletion of mast cells induced by C48/80, showed a decreased influx of neutrophils into the peritoneal cavity after 4 hours of zymosan-induced peritonitis,<sup>27</sup> and into the aqueous humour after 24 hours of endotoxin-induced uveitis,<sup>28</sup> compared to animals with non-depleted mast cells. Furthermore, in a model of pollen-induced AC, mast cell-deficient mice did not exhibit clinical signs and eosinophilia in the conjunctiva as severe as in the wild-type animals. This effect was reversed when deficient animals were repopulated with mast cells.<sup>29,30</sup> These results show that mast cells are essential in inducing the initial response to allergic conjunctivitis (clinical signs) and recruitment of eosinophils.

Pharmacological treatment with SCG and both rGal-1 concentrations (0.3 and 3 µg/eye) abrogated the effect of C48/80 challenge by reducing clinical signs of conjunctivitis, mast cell degranulation and eosinophilia, as well as the expression of EPX. Our findings reinforce the important regulatory role of rGal-1 in mast cell activation and consequent inhibition of ocular inflammation. In fact, SCG is a nonsteroidal anti-inflammatory drug traditionally described as an inhibitor of mast cell degranulation, and consequent release of histamine and other inflammatory mediators.<sup>31</sup> In relation to rGal-1, recent studies have demonstrated that lack of endogenous Gal-1 in mice causes a greater influx of eosinophils in bronchoalveolar fluid and lung after induction of asthma by OVA.<sup>25</sup> *In vitro*, rGal-1 administration reduced eotaxin-induced migration of eosinophils, which is independent of increased adhesion of these cells to the VCAM-1 adhesion molecule.<sup>25</sup> Additionally, studies using OVA-induced AC mouse models showed that systemic rGal-1 treatment reduced eotaxin and RANTES levels in the lymph nodes 24 hours after the final OVA challenge and compared with the untreated group.<sup>16</sup> However, in the C48/80-induced conjunctivitis model in rats, no differences were detected in the production of eotaxin and RANTES after rGal-1 or SCG eye drop treatments relative to the untreated C48/80 group. These different results regarding the effect of rGal-1 on chemokine release can probably be explained by the different samples and experimental models used.

Another interesting aspect detected in our rat model was the marked increase of IFN-γ, IL-6 and IL-10 production in the eyes after treatment with rGal-1 (0.3 µg) compared to the untreated C48/80. The

cytokines IFN- $\gamma$  and IL-6 can stimulate mast cell activation, <sup>24,32</sup> while IL-10 inhibits mast cell activation. <sup>23</sup> IL-10-deficient mice exhibit reduced numbers of intact mast cells after administration of C48/80, an effect reversed by the administration of recombinant IL-10. <sup>23</sup> In addition, administration of recombinant IL-10 in an OVA-induced allergic rhinitis model reduced the influx of eosinophils and mast cells into the nasal mucosa, as well as reducing IL-5 and IL-17 in the nasal lavage fluid. <sup>33</sup>

In contrast, ocular instillation of higher concentration rGal-1 (3  $\mu$ g) and SCG in rat eyes decreased IL-4 levels in relation to the untreated C48/80 group. Similarly, in murine AC, systemic treatment with rGal-1 decreased IL-4 and IL-13 levels in lymph nodes 4 hours after the final OVA challenge. <sup>16</sup> Thus, the reduction of IL-4 levels may be associated with the ability of rGal-1 to inhibit the degranulation of mast cells producing this cytokine, <sup>34</sup> regulating the Th2 lymphocyte response and IgE production. Furthermore, our study also shows that rGal-1 at 3  $\mu$ g, but not at 0.3  $\mu$ g, and SCG eye drops produced a pronounced decrease in phosphorylated p38, JNK and ERK kinase levels in eye homogenates compared to the untreated C48/80 group. MAPKs are crucial to induce the expression of multiple genes that together regulate the immune response, <sup>21</sup> our data suggests that the higher concentration of rGal-1 eye drops is more effective in controlling the inflammatory response induced by C48/80.

Together, our findings show that pharmacological treatment by ocular instillation of rGal-1 has a potent immunomodulatory effect in two models of conjunctivitis, indicating that this lectin is an important therapeutic tool in ocular allergy.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP [grant numbers 2015/09858-3, 2016/02012-4]; and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq [grant number 308144/2014-7]. C.B.M. and T.B.L.R. were supported by the CAPES and FAPESP [2012/10574-1] scholarships. We thank Kátia de Vasconcelos from the Department of Morphology and Genetics, UNIFESP, for her technical assistance.

## REFERENCES

1. Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, Calder VL. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy*. 2006; **36**: 777-784.
2. Norling LV, Perretti M, Cooper D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. *J Endocrinol*. 2009; **201**: 169-184.
3. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 2004; **19**: 433-440.
4. Blaser C, Kaufmann M, Müller C, et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol*. 1998; **28**: 2311-2319.
5. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol*. 1998; **160**: 4831-4840.
6. Zuñiga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2001; **70**: 73-79.
7. La M, Cao TV, Cerchiaro G, et al. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol*. 2003; **163**: 1505-1515.
8. Gil CD, Cooper D, Rosignoli G, Perretti M, Oliani SM. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and-3 expression in a model of rat peritonitis. *Inflammation Research*. 2006; **55**: 99-107.
9. Gil CD, La M, Perretti M, Oliani SM. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. *Cell Biology International*. 2006; **30**: 338-344.
10. Norling LV, Sampaio AL, Cooper D, Perretti M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J*. 2008; **22**: 682-690.
11. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1999; **190**: 385-398.

12. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 2003; **124**: 1381-1394.
13. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol*. 2006; **176**: 6323-6332.
14. Gil CD, Gullo CE, Oliani SM. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2010; **4**: 74-84.
15. Zanon CeF, Sonehara NM, Girol AP, Gil CD, Oliani SM. Protective effects of the galectin-1 protein on in vivo and in vitro models of ocular inflammation. *Mol Vis*. 2015; **21**: 1036-1050.
16. Mello CB, Ramos L, Gimenes AD, Andrade TR, Oliani SM, Gil CD. Immunomodulatory effects of galectin-1 on an IgE-mediated allergic conjunctivitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; **56**: 693-704.
17. Ackerman S, Smith LM, Gomes PJ. Ocular itch associated with allergic conjunctivitis: latest evidence and clinical management. *Ther Adv Chronic Dis*. 2016; **7**: 52-67.
18. Tiligada E, Aslanis D, Delitheos A, Varonos D. Changes in histamine content following pharmacologically-induced mast cell degranulation in the rat conjunctiva. *Pharmacol Res*. 2000; **41**: 667-670.
19. Papathanassiou M, Giannoulaki V, Zampeli E, Tiligada E. Effect of aminoguanidine on the conjunctival histamine and nitrite levels in experimental conjunctivitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2011; **27**: 137-142.
20. Magone MT, Chan CC, Rizzo LV, Kozhich AT, Whitcup SM. A novel murine model of allergic conjunctivitis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998; **87**: 75-84.
21. Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; **13**: 679-692.
22. Suryawanshi A, Cao Z, Thitiprasert T, Zaidi TS, Panjwani N. Galectin-1-mediated suppression of *Pseudomonas aeruginosa*-induced corneal immunopathology. *J Immunol*. 2013; **190**: 6397-6409.

23. Bundoc VG, Keane-Myers A. IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Exp Eye Res.* 2007; **85**: 575-579.
24. Yu M, Eckart MR, Morgan AA, et al. Identification of an IFN- $\gamma$ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest.* 2011; **121**: 3133-3143.
25. Ge XN, Ha SG, Greenberg YG, et al. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; **113**: E4837-4846.
26. Giannoulaki V, Papathanassiou M, Sitaras NM, Tiligada E. Nadroparine inhibits the hypersensitivity response in the conjunctiva. *Eur J Pharmacol.* 2003; **481**: 119-124.
27. Ajuebor MN, Das AM, Virág L, Flower RJ, Szabó C, Perretti M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol.* 1999; **162**: 1685-1691.
28. da Silva PS, Girol AP, Oliani SM. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis.* 2011; **17**: 1310-1319.
29. Miyazaki D, Tominaga T, Yakura K, et al. Conjunctival mast cell as a mediator of eosinophilic response in ocular allergy. *Mol Vis.* 2008; **14**: 1525-1532.
30. Fukuda K, Ohbayashi M, Morohoshi K, Zhang L, Liu FT, Ono SJ. Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; **124**: 827-833.e822.
31. Owen CG, Shah A, Henshaw K, Smeeth L, Sheikh A. Topical treatments for seasonal allergic conjunctivitis: systematic review and meta-analysis of efficacy and effectiveness. *Br J Gen Pract.* 2004; **54**: 451-456.
32. Desai A, Jung MY, Olivera A, et al. IL-6 promotes an increase in human mast cell numbers and reactivity through suppression of suppressor of cytokine signaling 3. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; **137**: 1863-1871.e1866.



33. Wang SB, Deng YQ, Ren J, Xiao BK, Liu Z, Tao ZZ. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model. *BMC Immunol.* 2014; **15**: 9.
34. Komiyama H, Miyake K, Asai K, Mizuno K, Shimada T. Cyclical mechanical stretch enhances degranulation and IL-4 secretion in RBL-2H3 mast cells. *Cell Biochem Funct.* 2014; **32**: 70-76.



## 5. 1. DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo, avaliamos o efeito do tratamento farmacológico com a Gal-1 recombinante (rGal-1) na inflamação ocular, utilizando dois modelos experimentais de conjuntivite em roedores.

Inicialmente utilizamos um clássico modelo experimental de conjuntivite alérgica induzida pela OVA em camundongos Balb/c (SHOJI et al., 2005; CHUNG; NAM; KWEON, 2009; MELLO et al., 2015). A resposta inflamatória foi avaliada pelas análises de IgE específica e citocinas no sangue, histológicas e quantitativas das células inflamatórias no sangue e na conjuntiva palpebral, após 4 e 24h do último desafio com OVA. A eficácia do nosso modelo de CA foi comprovada pela detecção do aumento nos níveis de IgE anti-OVA no plasma dos animais sensibilizados com OVA em relação ao grupo controle imunizado com salina estéril. Interessantemente, na fase inicial da resposta alérgica, 4h, os animais tratados com rGal-1 ocular mostraram diminuição significativa dos níveis de IgE em relação ao grupo CA, corroborando estudos prévios usados em tratamento intraperitoneal, i. p., com rGal-1 (MELLO et al., 2015). Nesses estudos, o efeito antialérgico da rGal-1 foi associado com diminuição significativa dos sinais clínicos da conjuntivite, níveis de IgE anti-OVA, IL-4 e IL-13.

Em continuidade a esses achados, investigamos o efeito da administração de rGal-1 ocular na liberação das citocinas IL-10 (perfil Th2) e IFN- $\gamma$  (perfil Th1) no modelo experimental de CA. No plasma, o tratamento com rGal-1 na fase inicial, 4h, causou aumento significativo de IL-10 em relação ao grupo CA. A modulação positiva da IL-10 é relevante em modelo de CA, uma vez que essa citocina foi apontada como um regulador da desgranulação de mastócitos (BUNDOC; KEANE-MYERS, 2007). Além disso, os estudos com Gal-1 apontam um efeito no aumento da produção dessa citocina associado com sua atividade anti-inflamatória (TOSCANO et al., 2006; SURYAWANSHI et al., 2013), corroborando nossos achados no plasma dos animais.

Além disso, esse tratamento com rGal-1 ocular induziu diminuição significativa de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo CA 4/24h. O efeito da regulação negativa da Gal-1 na produção de IFN- $\gamma$  observado nos olhos em nosso estudo está de acordo com outras investigações envolvendo essa lectina usando diferentes modelos de doenças autoimunes (RABINOVICH et al., 1999; SANTUCCI et al., 2003; TOSCANO et al., 2006). Estudos utilizando modelos de conjuntivite alérgica (STERN; SIEMASKO; NIEDERKORN, 2005) e de asma (YU et al., 2011) induzidos por pólen e OVA,

respectivamente, demonstraram significativa redução dos sinais clínicos dessas doenças e do influxo de leucócitos para os tecidos em camundongos nocautes para IFN- $\gamma$  comparados aos animais selvagens. Nesses mesmos trabalhos, os pesquisadores verificaram que a neutralização do IFN- $\gamma$  pelo tratamento dos animais selvagens com anticorpo específico induziu efeitos semelhantes aos observados para os animais nocautes. Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram que o IFN- $\gamma$  é capaz de ativar os mastócitos, previamente sensibilizados com anticorpos IgE, induzindo a liberação de histamina, IL-6 e IL-13 após 1 ou 24h do desafio com antígenos específicos (YU et al., 2011). Associados, esses dados sugerem um efeito protetor importante da rGal-1 na alergia ocular por meio do controle de IgE específica e citocinas Th1 e Th2.

Nosso estudo também demonstrou que o tratamento com a rGal-1 por instilação ocular provocou redução de neutrófilos do sangue periférico e aumentou significativamente o número de eosinófilos, linfócitos em relação aos animais não tratados e desafiados com OVA. No entanto, essas alterações não foram relacionadas com maior migração dos leucócitos para a conjuntiva palpebral comparado ao grupo CA.

As análises histológicas das conjuntivas palpebrais mostraram maior proporção de mastócitos desgranulados (61%) após 24h no grupo CA. Nesse mesmo tempo experimental, o efeito do tratamento com rGal-1 por instilação reduziu a proporção de células desgranuladas (40%). Outras investigações em modelo de CA induzida por pólen, demonstraram que camundongos deficientes para mastócitos, após desafio com pólen no saco conjuntival, não apresentaram sinais clínicos e eosinofilia na conjuntiva tão intensos como nos animais selvagens (MIYAZAKI et al., 2008; FUKUDA et al., 2009). Esse efeito foi revertido quando os animais deficientes foram repovoados com mastócitos, mostrando que essas células são essenciais na indução da resposta inicial à conjuntivite alérgica, sinais clínicos, e recrutamento de eosinófilos. Dessa maneira, no modelo experimental de CA, a ação exógena da Gal-1 por instilação direta no saco conjuntival está associada com a redução da ativação dos mastócitos e, conseqüentemente, na regulação da alergia ocular.

Para corroborar esses achados, avaliamos o efeito do tratamento farmacológico da rGal-1 na inflamação da ocular, usando um modelo experimental de conjuntivite induzida pelo composto 48/80 em ratos Wistar (TILIGADA et al., 2000; PAPATHANASSIOU et al., 2011).

Inicialmente, confirmamos a eficácia de nosso modelo experimental pelo escore clínico, após 20 minutos da aplicação do composto 48/80. Intenso edema de pálpebra, conjuntiva e lacrimejamento foram associados com aumento significativo da proporção de mastócitos desgranulados na conjuntiva palpebral dos animais instilados com C48/80 e comparado aos animais controles, instilados somente com PBS. A rápida ativação dos mastócitos pelo C48/80 implica na liberação de seus mediadores pré-estocados, como a histamina, efeito corroborado pela diminuição significativa dos seus níveis nos macerados de olhos após 6h em relação ao controle, cujos mastócitos estavam intactos. Outros estudos utilizando o mesmo modelo de conjuntivite induzida pela instilação do C48/80 em ratos, detectaram diminuição dos níveis de histamina nos macerados de conjuntiva após 45 min, 1, 12 e 24h (TILIGADA et al., 2000; GIANNOULAKI et al., 2003; PAPATHANASSIOU et al., 2011).

Em nossos estudos detectamos ainda intenso influxo de eosinófilos na conjuntiva após aplicação do 48/80, efeito corroborado pela intensa imunorreatividade da peroxidase eosinofílica (EPX) nos macerados dos olhos. A importância dos mastócitos na indução da transmigração de leucócitos tem sido demonstrada em modelos de inflamação aguda (AJUEBOR et al., 1999), sistêmica (DA SILVA, GIROL e OLIANI, 2011) e alérgica (MIYAZAKI et al., 2008; FUKUDA et al., 2009). Dois desses estudos, usando método de depleção seletiva dos mastócitos pelo C48/80 mostraram, na cavidade peritoneal, diminuição do influxo de neutrófilos, após 4h, da indução de peritonite por zymosan (AJUEBOR et al., 1999), e no humor aquoso, após 24h, da indução de uveíte por lipopolissacarídeo (DA SILVA, GIROL e OLIANI, 2011), comparado aos animais com mastócitos não depletados. Dessa maneira, em nosso modelo experimental de conjuntivite, a intensa desgranulação dos mastócitos provocada pelo C48/80 induz a alta migração de eosinófilos observada na conjuntiva palpebral.

Como esperado, o tratamento farmacológico com cromoglicato de sódio promoveu a inibição da desgranulação dos mastócitos após estímulo com o C48/80, efeito observado também pela diminuição dos sinais clínicos da conjuntivite e redução da eosinofilia. De fato, o cromoglicato de sódio é uma droga anti-inflamatória não

esteróide, tradicionalmente descrita como um estabilizador dos mastócitos. Essa droga inibe a desgranulação dos mastócitos sensibilizados, e consequente liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios (OWEN et al., 2004).

Caracterizado esse efeito anti-inflamatório do cromoglicato de sódio em nosso modelo de conjuntivite, direcionamos os estudos para a compreensão dos efeitos provocados pelo tratamento farmacológico com a rGal-1. Semelhantemente ao cromoglicato, as duas concentrações testadas de rGal-1 foram eficazes na redução dos sinais clínicos da conjuntivite, assim como na diminuição da ativação dos mastócitos. Semelhantemente, o pré-tratamento farmacológico com a rGal-1 reduziu o edema na pata de ratos, induzido pela injeção de fosfolipase A2 do veneno de abelha, e o número de mastócitos no tecido conjuntivo após 4h (RABINOVICH et al., 2000). Na conjuntivite alérgica induzida por OVA em camundongos, o tratamento sistêmico com rGal-1 também reduziu os sinais clínicos e produção de IgE na fase inicial da resposta inflamatória (MELLO et al., 2015). Esses resultados reforçam o importante papel regulador da rGal-1 na ativação dos mastócitos e consequente inibição da resposta inflamatória ocular.

Nos tratamentos realizados com as diferentes concentrações de rGal-1 foi verificado redução da migração de eosinófilos, assim como a expressão de EPX nos macerados de olhos. Estudos recentes demonstraram que a ausência de Gal-1 em camundongos causa maior influxo de eosinófilos no fluido broncoalveolar e no pulmão após indução de asma por OVA (GE et al., 2016). *In vitro*, a administração de rGal-1 também reduziu a migração dos eosinófilos induzida pela eotaxina, fator independente do aumento da adesão dessas células à molécula de adesão VCAM-1 (GE et al., 2016). Além disso, estudos usando modelo de conjuntivite alérgica induzida por OVA em camundongos, mostraram que o pré-tratamento sistêmico com rGal-1 reduziu os níveis de eotaxina e RANTES nos linfonodos após 24 h do último desafio com OVA e em comparação com o grupo não tratado (MELLO et al., 2015).

Outro aspecto interessante detectado em nosso modelo foi a diminuição significativa da produção de IL-4 nos olhos pelos tratamentos farmacológicos rGal-1 3 µg e cromoglicato em relação ao C48/80 sem tratamento. Similarmente, em modelo de conjuntivite alérgica em camundongos foi demonstrado o papel da rGal-1 na diminuição dos níveis de IL-4 e IL-13 nos linfonodos, após 4h do último desafio com OVA (MELLO et al., 2015). Assim, a redução dos níveis de IL-4 pode estar associada com a propriedade da rGal-1 de inibir a desgranulação dos mastócitos que também

produzem essa citocina, promovendo a resposta de linfócitos Th2 e produção de IgE (MELLO et al., 2015).

Por outro lado, em nossos estudos, a instilação ocular de menor concentração de rGal-1 (0,3 µg) nos olhos dos ratos induziu aumento significativo de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 em relação ao grupo C48/80 sem tratamento. As citocinas IFN- $\gamma$  e IL-6 são capazes de estimular ativação de mastócitos (YU et al., 2011; DESAI et al., 2016), enquanto a IL-10 inibe essa ativação (BUNDOC; KEANE-MYERS, 2007). Animais nocautes para IL-10 apresentam número reduzido de mastócitos intactos após administração do C48/80, efeito revertido pela administração de IL-10 recombinante (BUNDOC; KEANE-MYERS, 2007). Além disso, a administração de IL-10 recombinante em modelo de rinite alérgica induzida por ovalbumina reduziu o influxo de eosinófilos e mastócitos na mucosa nasal, assim como a produção de IL-5 e IL-17 no fluido de lavado nasal (WANG et al., 2014).

Essas diferenças na produção de citocinas induzidas por diferentes concentrações de rGal-1 também foram verificadas na ativação das MAPKs nos olhos. A expressão das quinases fosforiladas p38, JNK e ERK foi menor no tratamento com rGal-1 3 µg, assim como detectado para o cromoglicato de sódio. Considerando que as MAPKs são fundamentais na indução da expressão de múltiplos genes que regulam a resposta imune (ARTHUR; LEY, 2013), nossos dados sugerem que a maior concentração de rGal-3 é mais eficaz no controle da resposta inflamatória induzida pelo C48/80.





## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

1. No modelo experimental de CA, induzida por OVA nos camundongos Balb/c, o tratamento farmacológico com rGal-1 por instilação ocular:
  - diminui os níveis plasmáticos de **IgE anti-OVA** na fase inicial da resposta alérgica (4h) comparado ao grupo CA;
  - aumenta os níveis plasmáticos de **IL-10**;
  - diminui os níveis de **IFN- $\gamma$**  nos homogeneizados dos olhos.
  - aumenta o número de eosinófilos (4h), linfócitos (4 e 24h) e monócitos (24h) circulantes, e reduz neutrófilos (24h).
  - reduz a proporção de mastócitos desgranulados (40%) na conjuntiva palpebral, após 24h, em comparação ao grupo sem tratamento (61%).
2. No modelo de conjuntivite induzido pelo C48/80, a instilação ocular de rGal-1, em ambas concentrações (0,3 e 3  $\mu\text{g}$ ), possui efeito semelhante ao cromoglicato de sódio, comparado aos olhos não tratados e desafiados com o C48/80. Assim, os tratamentos farmacológicos com rGal-1:
  - reduzem os sinais clínicos da conjuntivite induzida pelo C48/80, a **desgranulação de mastócitos** e **influxo de eosinófilos** na conjuntiva palpebral;
  - diminuem a expressão da **peroxidase eosinofílica (EPX)** e das **quinases fosforiladas ativadas por mitógenos (p-p38, p-JNK e p-ERK)** nos homogeneizados de olhos;
  - não alteram os níveis de **histamina** nos homogeneizados de olhos em relação aos seus respectivos controles;
  - não alteram os níveis de **eotaxina e RANTES** no fluido lacrimal dos animais em relação ao C48/80 não tratado;
  - na concentração de 3  $\mu\text{g}$  diminui a produção de **IL-4** nos olhos em relação ao C48/80 não tratado, enquanto na concentração de 0,3  $\mu\text{g}$  aumenta os níveis de **IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10**.

Em conjunto, nossos achados evidenciam que o tratamento farmacológico por instilação ocular de rGal-1 possui potente efeito imunomodulador nos dois modelos de conjuntivite, indicando essa lectina como importante ferramenta terapêutica.



## 7. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, S.; SMITH, L.M.; GOMES, P. J. Ocular itch associated with allergic conjunctivitis: latest evidence and clinical management. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, Los Angeles, v.7, n.1, p.52-67, Jan 2016. ISSN 2040-6223.
- ARTHUR, J. S.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nature Reviews. Immunology**, London, v.13, n.9, p.679-92, Set 2013. ISSN 1474-1733.
- ARTUC, M.; HERMES, B.; STECKELINGS, U.M.; GRÜTZKAU, A.; HENZ, B.M. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing-active participants or innocent bystanders? **Experimental Dermatology**, v.8, n.1, p.1-16, Feb 1999. ISSN 0906-6705
- AJUEBOR, M. N.; DAS, A. M.; FLOWER, R. I.; SZABÓ, C.; PERRETTI, M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cell in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for a loop involving endogenous IL-10. **Journal of Immunology**, Beltimore, v.162, n.3, p.1685-1691, Feb 1999. ISSN 00221767.
- BISCHOFF, S.C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.2, p.93-104, Fev 2007. ISSN 1474-1733.
- BLASER, C.; KAUFMANN, M.; MÜLLER, C.; ZIMMERMANN, C., WELLS, V.; MALLUCCI L., PIRCHER, H. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. **European Journal of Immunology**, Weinhein, v.28, n.8, p.2311-19, Aug 1998. ISSN 0014-2980.
- BUNDOC, V. G.; KEANE-MYERS, A. IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. **Experimental Eye Research**, London, v.85, n.4, p.575-79, Oct 2007. ISSN 0014-4835.
- CHO, M., CUMMINGS, R. D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, n.10, p.5207-12, Mar 1995. ISSN 0021-9258.
- CHUNG, S. H.; NAM, K. H.; KWEON, M. N. Staphylococcus aureus accelerates an experimental allergic conjunctivitis by Toll-like receptor 2-dependent manner. **Clinical Immunology**, Orlando, v.131, n.1, p.170-77, Apr 2009. ISSN 1521-7035.
- COOPER, D.; NORLING, L. V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **Journal of Leukocyte Biology**, New york, v.83, n.6, p.1459-66, Jun 2008. ISSN 0741-5400.
- CORRÊA, M. P.; ANDRADE, F. E. C.; GIMENES, A. D.; GIL, C. D. Anti-inflammatory effect of galectin-1 in a murine model of atopic dermatitis, **Journal of**

- Molecular Medicine**, Germany, v.95, n.9, p.1005-1015, Sep 2017. ISSN 0946-2716.
- DA SILVA, E. Z.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell, **The journal of histochemistry and cytochemistry**, Baltimore, v.62, n.10, p.698-738, Oct 2014. ISSN 0022-1554.
- DA SILVA, P. S.; GIROL, A. P.; OLIANI, S. M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 17, p. 1310-19, May 2011. ISSN 1090-0535.
- DE VASCONCELOS, D. I.; LEITE, J. A.; CARNEIRO, L.T.; PIUVEZAM, M. R.; DE LIMA, M.R.; DE MORAIS, L. C.; RUMJANEK, V. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, Oxford, May 2011. ISSN 0962-9351.
- DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. **Roitt - Fundamentos de Imunologia**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 552p.
- DESAI, A.; JUNG, M-Y; OLIVERA, A.; M. GILFILLAN, A. M.; PRUSSIN, C.; KIRSHENBAUM, A. S.; MICHAEL, A.; BEAVEN, M. A.; METCALFE, D. D. IL-6 promotes an increase in human mast cell numbers and reactivity through suppression of suppressor of cytokine signaling 3. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v.137, n.6, p.1863-187, Jun 2016. ISSN 1097-6825.
- DOUAIHER, J.; SUCCAR, J.; LANCEROTTO, L.; GURISH, M.F.; ORGILL, D.P.1; HAMILTON, M.J.; KRILIS, S. A.; STEVENS, R. . Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. **Advances in Immunology**, v.122, p.211–52, Jan 2014. ISSN 0065-2776.
- FRIEDLAENDER, M. H. Ocular allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v.11, n.5, p.477-82, Oct 2011. ISSN 1528-4050.
- FERRY X., BREHIN S., KAMEL R., LANDRY Y. G. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues, **Peptides**, New York, v.23, n.8, p.1507-15, Aug 2002. ISSN 0196-9781.
- FUKUDA, K.; OHBAYASHI, M.; MOROHOSHI, K.; ZHANG, L.; LIU, F. T.; ONO, S. J. Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v.124, n.4, p.827-33, Oct 2009. ISSN 0091-6749.
- GALLETTI, J.G.; GUZMÁN, M.; GIORDANO, M.N. Mucosal immune tolerance at the ocular surface in health and disease. **Immunology**, Oxford, v.150, n.4, p.397-407, Apr 2017. ISSN: 0019-2805.
- GALLI, S. J. The Paul Kallos Memorial Lecture. The mast cell: a versatile effector cell for a challenging world. **International Archives of Allergy and Immunology**, Switzerland, v.113, n.1-3, p.14-22, May-Jul 1995. INSS 1018-2438.

- GALLI, S. J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nature Reviews. Immunology**, London, v.8, n.6, p.478-86, Jun 2008. ISSN 1474-1733.
- GE, X. N.; HÁ, S. G.; GREENBERG, Y. G.; RAO, A.; BASTAN, I.; BLIDNER, A. G.; RAO, S. P.; RABINOVICH, G. A.; SRIRAMARAO, P. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.113, n.33, p.4837-46, Aug 2016 ISSN 1091-6490.
- GERALDINE, M.; CHONG NETO, H. J.; RIEDI, C. A.; ROSÁRIO, N. A Epidemiology of ocular allergy and co-morbidities in adolescents. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.89, n.4, p.327-420, Jul-Ag 2013. ISSN 1678-4782.
- GIANNOULAKI, V.; PAPATHANASSIOU, M.; SITARAS, N. M.; TILIGADA, E. Nadroparine inhibits the hypersensitivity response in the conjunctiva. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.481, n.1, p.119-24, Nov 2003. ISSN 0014-2999.
- GIL, C. D.; COOPER, D.; ROSIGNOLI, G.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflammation Research: official journal of European Histamine Research Society**, Basel, v.55, n.3, p.99-107, Mar 2006a. ISSN 1023-3830.
- GIL, C. D.; LA, M.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biology Internacional**, London, v.30, n.4, p.338-44, Apr 2006b. ISSN 1065-6995.
- GIL, C. D.; GULLO, C. E.; OLIANI, S. M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madison, v.4, n.1, p.74-84, Dec 2010. ISSN 1936-2625.
- GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation, **Nature Reviews. Immunology**, v.6, n.3, p.218-30, Mar 2006. ISSN 1474-1733.
- GRONEBERG, D. A.; BIELORY, L.; FISCHER, A.; BONINI, S.; WAHN, U. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. **Allergy**, Copenhagen, v.58, n.11, p.1101-13, Nov 2003. ISSN 0105-4538.
- GURISH, M. F.; AUSTEN, K.F. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. **Immunity**, Cambridge, v.37, n.1, p.25-33, Jul 2012. ISSN 1074-7613.
- HARVIMA, I.T.; NILSSON, G. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. **Acta dermato-venereologica**, Sweden, v.91, n.6, p.644-50, Oct 2011. ISSN 0001-5555.
- HERMES, B.; FELDMANN-BÖDDEKER, I.; WELKER, P.; ALGERMISSEN, B.; STECKELINGS, M.U.; GRABBE, J.; HENZ, B.M.. Altered expression of mast

- cell chymase and tryptase and of c-Kit in human cutaneous scar tissue. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.114, n.1, p.51-5, Jan 2000. ISSN: 0022-202X
- HOKAMA, A.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v.14, n.33, p. 5133-37, Sep 2008. ISSN 1007-9327.
- HOANG-XUAN, T.; BAUDOIN, C.; CREUZOT-GARCHER, C. **Inflammatory Diseases of the Conjunctiva**.1<sup>st</sup> ed. Marseille: Rapport Annuel, Marseille, 2001, 297p.
- ILARREGUI, J. M.; CROCI, D. O.; BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; SALATINO, M.; VERMEULEN, M. E.; GEFFNER, J. R.; RABINOVICH, G. A. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory-circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. **Nature Immunology**, New York, v.10, n.9, p.981-91, Sep 2009. ISSN 1529-2916.
- IRKEC, M. T.; BOZKURT, B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v.12, n.5, p.534-39, Oct 2012. ISSN 1528-4050.
- JOHANSSON, S. G.; HOURIHANE, J. O.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; HAAHTELA, T.; KOWALSKI, M. L.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy. European journal of allergy and clinical immunology**, v.56, n.12, p.1229, Sep 2001. ISSN 0105-4538.
- JOHNSON, A. R.; HUGLIT, T. E.; MULLER-EBERHARD, H. J. Release of Histamine From Rat Mast Cells by the Complement Peptides C3a and C5a. **Immunology**, Oxford, v.28, p.1067-80, Jun 1975. ISSN 0019-2805.
- KIM, H. M.; SHIN, H. Y.; CHOO, Y. K.; PARK, J. K. Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by sodium salicylate. **Immunology**, Oxford, v.96, n.4, p.551-6, Apr 1999. INSS 0019-2805.
- KOMI, D. E. A.; RAMBASEK, T.; BIELORY, L. Clinical implications of mast cell involvement in allergic conjunctivitis. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Copenhagen, Nov 2017. ISSN 0105-4538.
- KOMIYAMA, H.; MIYAKE, K.; ASAI, K.; MIZUNO, K.; SHIMADA T. Cyclical mechanical stretch enhances degranulation and IL-4 secretion in RBL-2H3 mast cells. **Cell biochemistry and function**, Oxford, v.32, n.1, p.70-6, Apr 2015. ISSN 0263-6484
- LA, M.; CAO, T. V.; CERCHIARO, G., CHILTON, K.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; OLIANI S. M.; CHERNAJOVSKY, Y.; PERRETTI, M. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.163, n. 4, p.1505-15, Oct 2003. ISSN 0002-9440.

- LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, Norwell, v.19, n.7-9, p.433-40, 2002. ISSN 0282-0080.
- LEONARDI, A.; CURNOW, S. J.; ZHAN, H.; CALDER, V. L. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v.36, n.6, p.777-84, Jun 2006. ISSN 0954-7894.
- LEONARDI, A.; BOGACKA, E.; FAUQUERT, J. L.; KOWALSKI, M. L.; GROBLEWSKA, A.; JEDRZEJCZAK-CZECHOWICZ, M.; DOAN, S.; MARMOUZ, F.; DEMOLY, P.; DELGADO, L. Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Copenhagen, v.67, n.11, p.1327-3, Nov 2012. ISSN 0105-4538.
- LEONARDI, A.; CASTEGNARO, A.; VALERIO, AL.; LAZZARINI, D. Epidemiology of allergic conjunctivitis: clinical appearance and treatment patterns in a population-based study. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v.5, n.5, p.482-8, Oct 2015. ISSN 1528-4050.
- LIU, F. T., R. J. PATTERSON, AND J. L. WANG. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1572, n.2-3, p.263-73, Sep 2002. ISSN 0006-3002.
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1183, p.158-82, Jan 2010. ISSN 1749-6632.
- MAGONE, M. T.; CHAN, C. C.; RIZZO, L. V.; KOZHICH, A. T.; WHITCUP, S. M. A novel murine model of allergic conjunctivitis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v.87, n.1, p.75-84, Apr 1998. ISSN 0090-1229.
- MARBACK, P. M. F.; DE FREITAS, D.; PARANHOS JUNIOR, A.; BELFORT JUNIOR, R. Epidemiological and clinical features of allergic conjunctivitis in a reference center. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v.70, n.2, p.312-6, Mar-Apr 2007. ISSN 0004-2749.
- MELLO, C. B.; RAMOS, L.; GIMENES, A. D.; ANDRADE, T. R.; OLIANI, S. M.; GIL, C. D. Immunomodulatory effects of galectin-1 on IgE-mediated allergic conjunctivitis model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v.56, n.2, p.693-704, Jan 2015. ISSN 1552-5783.
- MÉNDEZ-HUERGO, S. P., A. G. BLIDNER; RABINOVICH, G. A 2017. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. **Current Opinion Immunology**, v.45, p.8-15, Apr 2017. ISSN 0952-7915.
- MIYAZAKI, D.; TOMINAGA, T.; YAKURA, K.; KUO, C-H.; KOMATSU, N.; INOUE, Y.; ONO, S. J. Conjunctival mast cell as a mediator of eosinophilic response in ocular allergy. **Molecular Vision**, Atlanta, v.14, p.1525-32, Ag 2008. ISSN 1090-0535.



- NORLING, L. V.; SAMPAIO, A. L.; COOPER, D.; PERRETTI, M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. **FASEB Journal: official publication of the Federation of American**, Bethesda, v.22, n.3, p.682-90, Mar 2008. ISSN 1530-6860.
- NORLING, L.V.; PERRETTI, M.; COOPER D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. **The Journal Endocrinology**, Bristol, v. 201, n.2, p.169-84, 2009. ISSN 0022-0795.
- OWEN, C. G.; SHAH, A.; HENSHAW, K.; SMEETH, L.; AZIZ SHEIKH, A. Topical treatments for seasonal allergic conjunctivitis: systematic review and meta-analysis of efficacy and effectiveness. **British Journal of General Practice**, London, v.54, n.503, p.451-6, Jun 2004. ISSN 0035-8797.
- OHTA, Y.; KONGO, M.; KISHIKAWA, T. Preventive effect of melatonin on the progression of alpha-naphthylisothiocyanate-induced acute liver injury in rats. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v.34, n.3, p.185-93, Apr 2003. ISSN 0014-2999.
- PACHARN, P.; VICHYANOND, P. Immunomodulators for conjunctivitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v.13, n. 5, p. 550-57, Oct 2013. ISSN 1528-4050.
- PALOMAKI, V. A. B.; LAITINEN, J. T. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain sections. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p.596–606, Mar 2006, ISSN 0007-1188.
- PAULSEN, F. P.; BERRY, M. S. Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, Germany, v.4, n.1, p.1-53, May 2006. INSS 0079-6336.
- PAPATHANASSIOU, M.; GIANNOULAKI, V.; ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. Effect of aminoguanidine on the conjunctival histamine and nitrite levels in experimental conjunctivitis. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, New York, v.27, n.2, p.137-42, Apr 2011. ISSN 1557-7732
- PEJLER, G.; RÖNNBERG, E.; WAERN, I.; WERNERSSON, S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**, New York, v.115, n.4981-90, Jun 2010. ISSN 0006-4971.
- PELIKAN, Z. **Conjunctivitis - A Complex and Multifaceted Disorders**. Rijeka: InTech, 2011. 246p.
- PUXEDDU, I.; RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; LEVI-SCHAFFER, F. Mast cells and eosinophils: a novel link between inflammation and angiogenesis in allergic diseases. **The Journal of allergy and clinical immunology**, St Louis, v.116, n.3, p.531-6, Sep 2005. ISSN 0091-6749.
- RABINOVICH, G. A.; IGLESIAS, M. M.; MODESTI, N. M.; CASTAGNA, L. F.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; RIERA, C. M.; SOTOMAYOR, C. E. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells:

- biochemical and functional characterization. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.160, n.10, p.4831-40, May 1998. ISSN 0022-1767.
- RABINOVICH, G. A.; DALY, G.; DREJA, H.; TAILOR, H.; RIERA, C. M.; HIRABAYASHI, J. CHERNAJOVSKY, Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.190, n.3, p.385-98, Aug 1999. ISSN 0022-1007.
- RABINOVICH, G. A.; SOTOMAYOR, C. E.; RIERA, C. M.; BIANCO, I.; CORREA, S. G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.30, n.5, p.1331-39, May 2000. ISSN 0014-2980.
- READ, R. W.; YU, F.; ACCORINTI, M.; BODAGHI, B.; CHEE, S. P.; FARDEAU, C.; GOTO, H.; HOLLAND, G. N.; KAWASHIMA, H.; KOJIMA, E.; LEHOANG, P.; LEMAITRE, C.; OKADA, A. A.; PIVETTI-PEZZI, P.; SECCHI, A.; SEE, R. F.; TABBARA, K. F.; USUI, M.; RAO, N. A. Evaluation of the effect on outcomes of the route of administration of corticosteroids in acute Vogt-Koyanagi-Harada disease, **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v.142, n.1, p.119-124, Jul 2006. ISSN 0002-9394.
- RIVERA, J.; GILFILLAN, A.M. Molecular regulation of mast cell activation, **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.117, n.6, p.1214-25, Jun 2006. ISSN 2006.
- ROSARIO, N.; BIELORY, L. Epidemiology of allergic conjunctivitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hangerstown, v.11, n.5, p.471-76, Oct 2011. ISSN 1528-4050.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia - em correlação com biologia celular e molecular. Texto e Atlas**. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1008p.
- ROSENBAUM, J. T. Future for biological therapy for uveitis. **Current Opinion in Ophthalmology**, Philadelphia, v.21, n.6, p.473-77, Nov 2010. ISSN 1531-7021.
- RUDICH, N.; RAVID, K.; SAGI-EISENBERG, R. Mast cell adenosine receptors function: a focus on the A<sub>3</sub> adenosine receptor and inflammation, **Frontiers in Immunology**, Switzerland, v.4, n.3, p.134, Jun 2012. ISSN 1664-3224.
- SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; CAMMILLERI, F.; SERVILLO, G.; FEDERICI, B.; MORELLI, A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, Baltimore, v.31, n.2, p. 399-406, Feb 2000. ISSN 0270-9139.
- SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; RUBINSTEIN, N.; MENCARELLI, A.; PALAZZETTI, B.; FEDERICI, B.; RABINOVICH, G. A.; MORELLI, A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, Baltimore, v.124, n.5, p.1381-94, May 2003. ISSN 0016-5085.
- SATO, S.; ST-PIERRE, P.; BHAUMIK; NIEMINEN, J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for

- pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunological Reviews**, v.230, n.1, p.172-87, Copenhagen, Jul 2009. ISSN 0105-28996.
- SHAKER, M.; SALCONE, E. An update on ocular allergy. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, Hagerstown, v.16, n.5, p.505-10, Oct 2016. ISSN 1528-4050.
- SHOJI, J.; SAKIMOTO, T.; MUROMOTO, K.; INADA, N.; SAWA, M.; RA, C. Comparison of topical dexamethasone and topical FK506 treatment for the experimental allergic conjunctivitis model in BALB/c mice. **Japanese Journal Ophthalmology**, Tokyo, v.49, n.3, p.205-10, May-Jun 2005. ISSN 0021-5155.
- SUGIMOTO, Y.; UMAKOSHI, K.; NOJIRI, N.; KAMEI, C. Effects of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v.351, n.1, p.1-5, Jun 1998. ISSN 0014-2999.
- SUH, W. M.; PARK, S. B.; LEE, S.; KIM, H. H.; SUK, K.; SON, J.H.; KWON, T.K.; CHOI, H.G.; LEE, S.H.; KIM, S.H. Suppression of mast-cell-mediated allergic inflammation by *Lindera obtusiloba*. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v.236, n.2, p.240-6, Feb 2011. INSS 1535-3702.
- SUNDBLAD, V.; MOROSI, L. G.; GEFFNER, J.R.; RABINOVICH, G. A. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. **Journal of immunology**, Baltimore, v.199, n.11, p.3721-30, Dec 2017. ISSN 0022-1767.
- STERN, M. E.; SIEMASKO, K. F.; NIEDERKORN, J. Y. The Th1/Th2 paradigm in ocular allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v.5, n. 5, p. 446-50, Oct 2005. ISSN 1528-4050.
- SURYAWANSHI, A.; CAO, Z.; THITIPRASERT, T.; ZAIDI, T. S.; PANJWANI, N. A. Galectin-1-mediated suppression of *Pseudomonas aeruginosa*-induced corneal immunopathology. **Journay Immunology**, Baltimore, v.190, n.12, p. 6397-409, Jun 2013. ISSN 0022-1767.
- TAKEDA, K.; GELFAND, E.W. Mouse models of allergic diseases. **Current Opinion in Immunology**, London, v.21, n.6, p.660-5 Dec 2009. INSS 09527915.
- THEOHARIDES, T.C.; KALOGEROMITROS, D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation, **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1088, p.78-99, Nov 2006. ISSN 0077-8923.
- TILIGADA, E.; ASLANIS, D.; DELITHEOS, A.; VARONOS, D. Changes in histamine content following pharmacologically-induced mast cell degranulation in rat conjunctiva. **Pharmacological Research**, London, v.41, n.6, p.667-70, Jun 2000. ISSN 1043-6618.
- TOSCANO, M. A.; COMMODARO, A. G.; ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; LIBERMAN, A.; SERRA, H. M.; HIRABAYASHI, J.; RIZZO, L. V.; RABINOVICH, G.A. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2 and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses.

- Journal of Immunology**, Baltimore, v.176, n.10, p.6323-32, May 2006. ISSN 0022-1767.
- WANG, S-B.; DENG, Y-Q.; REN, J., XIAO, B-k.; LIU, Z.; ZE-ZHANG TAO, Z-Z. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model. **BioMed Central Immunology**, London, v.15, p.01-09, Fev 2014. ISSN 1471-2172.
- WANG, X.; SADA, K.; YANAGI, S.; YANG, C.; REZAUL, K.; YAMAMURA, H. Intracellular Calcium Dependent Activation of p72 in Platelets. **The Journal of Biochemistry**, v.116, p.858, Oct 1994. ISSN: 0021-924X.
- WILSON, B. S.; OLIVER, J. M.; LIDKE, D. S. Spatio-temporal signaling in mast cells, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, v.716, p.91-106, 2011. ISSN 0065-2598.
- YU, M.; ECKART, M. R.; MORGAN, A. A.; MUKAI, K.; BUTTE, A. J.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Identification of an IFN- $\gamma$ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *The Journal of clinical investigation*. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v.121, n.8, p.133-43, Aug 2011. ISSN 1558-8238.
- ZANON, C. E. F.; SONEHARA, N. M.; GIROL, A. P.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M. Protective effects of the galectin-1 protein on in vivo and in vitro models of ocular inflammation. **Molecular Vision**, v.21, n.2, p.1036-50, Sep 2015. ISSN 1090-0535.
- ZUÑIGA, E.; RABINOVICH, G. A.; IGLESIAS, M. M.; GRUPPI, A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.70, n.1, p.73-9, Jul 2001. ISSN 0741-5400.



## 8.1. Certificado de Aprovação dos Comitês de Ética

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



# COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 08 de setembro de 2014

CEUA N 7611050814

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Cristiane Damas Gil (cpf: 133.490.918-06)

Depto/Disc: Histologia E Biologia Estrutural

Pesquisadores associados: Tamires Barbosa Lucena Da Rocha (unifesp); Cristiane Damas Gil (orientador)

Título do projeto: "ESTUDO HISTOLÓGICO E FUNCIONAL DA PROTEÍNA GALECTINA-1 EM MODELO MURINO DE CONJUNTIVITE ALÉRGICA TIPO I".

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

A conjuntivite alérgica (CA) representa uma doença complexa do sistema imune envolvendo a desgranulação dos mastócitos na conjuntiva e a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas que provocam a infiltração de células inflamatórias nesse tecido. Essa inflamação é o principal fator contribuinte para inúmeras desordens oculares, podendo levar a diminuição da acuidade visual, e até mesmo a cegueira. Nos tratamentos das inflamações intraoculares, em geral, são os glicocorticoides os medicamentos frequentemente administrados cujos efeitos colaterais estimulam buscas por novas estratégias terapêuticas. Entre os mediadores anti-inflamatórios, incluímos a proteína endógena galectina-1 (Gal-1) capaz de controlar o processo de transmigração dos leucócitos, liberação de citocinas e

desgranulação de mastócitos, contribuindo para a homeostase da reação inflamatória. Contudo, a expressão da Gal-1 em tecidos oculares normais e inflamados tem sido pouco estudada. Desse modo, analisaremos em modelo experimental de CA, a expressão e o mecanismo de ação da proteína Gal-1 nas conjuntivas palpebrais de camundongos. Os animais serão imunizados nos dias 0 e 7, por via subcutânea, com ovalbumina (OVA; 5 µg) e nos dias 14, 15 e 16, receberão instilação direta no saco conjuntival de 250 µg de OVA em 10 µl de salina estéril. Outro grupo de animais sensibilizados serão pré-tratados i.p. ou por instilação nos dias 14 a 16 com a proteína Gal-1 recombinante (rGal-1; 0,3 µg por animal), diluída em 0,1 mL ou 10 µl de salina estéril, respectivamente. Os animais controles receberão apenas salina estéril. Após 4 e 24 horas do último desafio com OVA, os animais serão anestesiados, submetidos a punção cardíaca para obtenção de sangue e, posteriormente, sacrificados por deslocamento cervical para retirada das pálpebras, lavado peritoneal e baco. Os estudos serão realizados por meio de: análises histopatológicas e quantitativas de mastócitos e eosinófilos nas conjuntivas; dosagens de IgE anti-ovalbumina no sangue, e; imuno-histoquímica e western blotting para detectar a expressão da proteína endógena Gal-1 nos mastócitos e baco, respectivamente. Os resultados contribuirão para o melhor entendimento da participação da Gal-1 nos processos inflamatórios oculares alérgicos e, possivelmente, para novas perspectivas terapêuticas.

#### ANIMAIS:

Serão utilizados:

- 35 Camundongos isogênicos Balb/c, Machos, com idade de 7-12 semanas Procedência: CEDEME

Manutenção: Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural

#### VIGÊNCIA DO ESTUDO:

início previsto para: outubro/2014 com término previsto para: outubro/2015

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 08/09/2014, **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.



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Atenciosamente,

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



## 8.1.2. Comissão de Ética do Uso de Animais IBILCE/UNESP-CSJRP



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

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

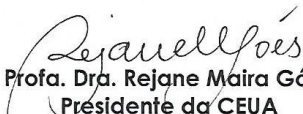
## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto/disciplina de pesquisa intitulado "**Efeito da galectina-1 nos mastócitos em modelo experimental de conjuntivite induzida pelo composto 48/80: análises *in vivo* e *in vitro***" (protocolo nº. 092/2014 - CEUA), sob responsabilidade da Professora Doutora Cristiane Damas Gil, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 13 de maio de 2014.

## CERTIFICATE

Certify that the project / research discipline entitled "Effect of galectin-1 in mast cells in an experimental model induced by compound 48/80 conjunctivitis: analysis *in vivo* and *in vitro*" (protocol no. 092/2014 - CEUA), under the responsibility of Professora Doutora Cristiane Damas Gil, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of this Institute, at the meeting of May 13, 2014.

São José do Rio Preto, 13 de maio de 2014.

  
Prof. Dra. Rejane Maira Góes  
Presidente da CEUA

## 8.2. Certificado de Submissão do Artigo

07/03/2018

UNIFESP :: CEO-17-10-0876: Manuscript submitted

Assunto **CEO-17-10-0876: Manuscript submitted**  
De Clinical and Experimental Ophthalmology <onbehalfof+v.cartwright+auckland.ac.nz@manuscriptcentral.com>  
Remetente <onbehalfof+v.cartwright+auckland.ac.nz@manuscriptcentral.com>  
Para <crisiane.gil@unifesp.br>  
Responder para <v.cartwright@auckland.ac.nz>  
Data 2017-10-05 18:35

UNIFESP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
099

Dear Dr. Gil

This is to acknowledge receipt of the following manuscript you submitted to Clinical and Experimental Ophthalmology:

CEO-17-10-0876: Treatment with galectin-1 eye drops regulate mast cell degranulation and attenuate the severity of conjunctivitis

The review of your manuscript will be supervised by a Section Editor. The editorial office will be in touch with you again after your manuscript has been reviewed.

Thank you for submitting your manuscript to Clinical and Experimental Ophthalmology.

Kind regards  
Vicky

Vicky Cartwright  
Managing Editor  
Clinical and Experimental Ophthalmology  
Department of Ophthalmology  
University of Auckland, Private Bag 92019  
Auckland, New Zealand  
Tel: +64 (0)9 923 8698