

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de 26/02/2020.



**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  $\mu$ 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

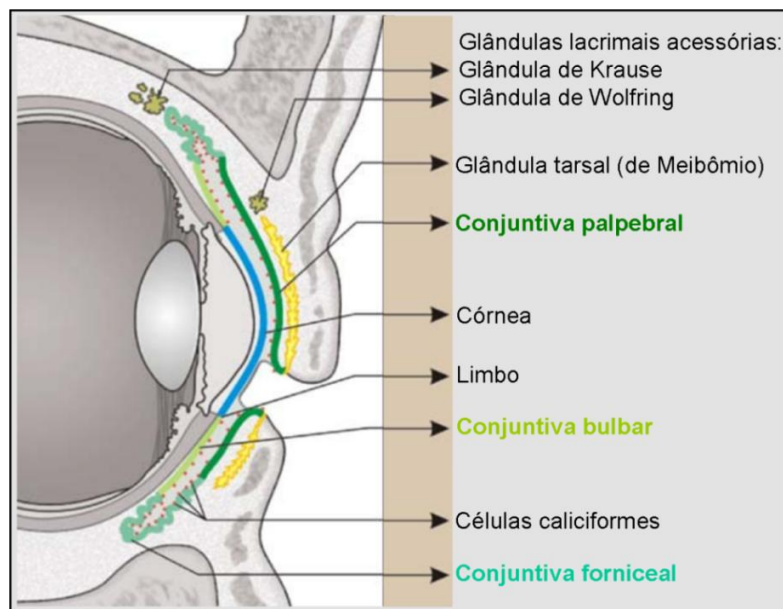




## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Conjuntiva

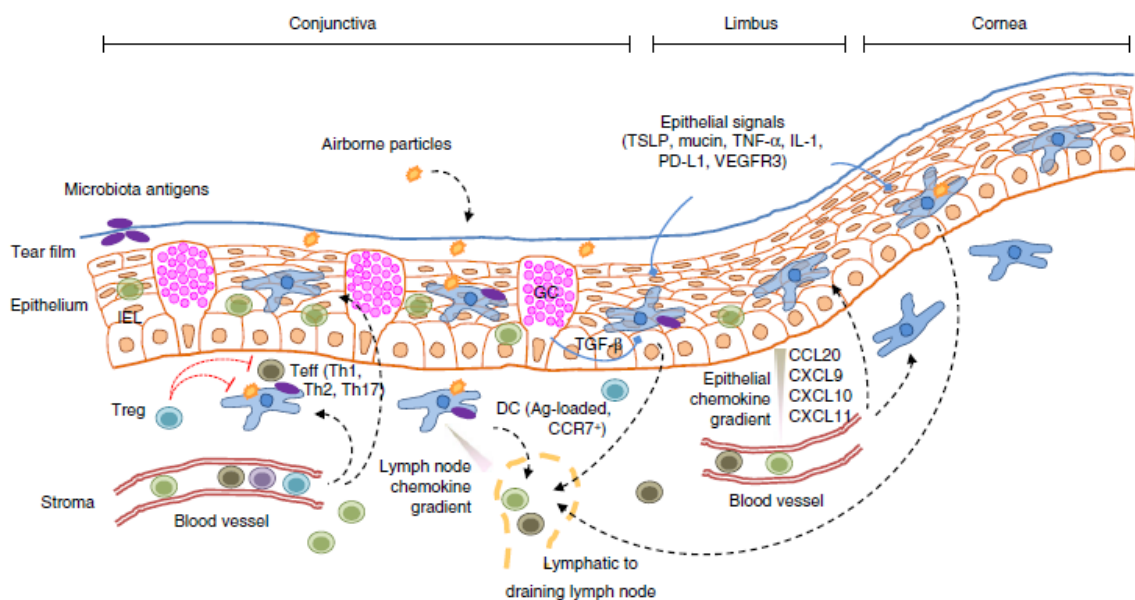
A conjuntiva, estrutura acessória do globo ocular, é uma membrana mucosa fina transparente. Anatomicamente, essa membrana está localizada na margem periférica da córnea, sobre a esclera (conjuntiva bulbar), fórnix do saco lacrimal (conjuntiva forniceal) e superfície interna das pálpebras (conjuntiva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

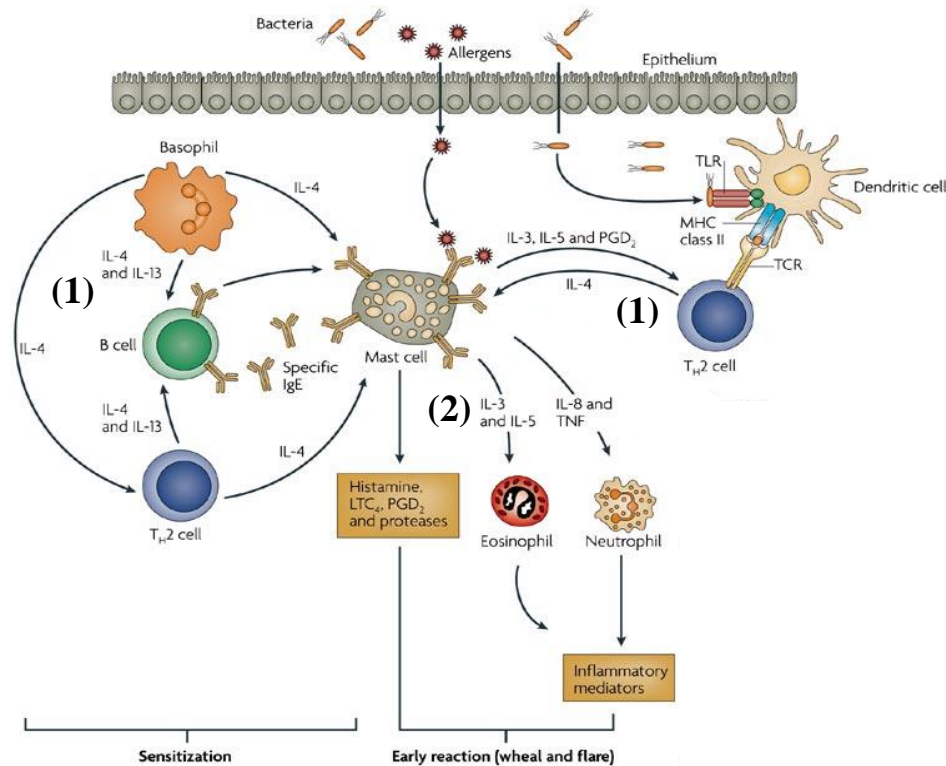


**Figura 2.** Alguns dos tipos de células e interações mais relevantes no sistema da superfície da mucosa ocular. Antígenos (Ag) transportados pelo ar e derivados da microbiota atingem o filme lacrimal, a camada mais externa da superfície ocular. As células epiteliais da conjuntiva e córnea, assim como 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).

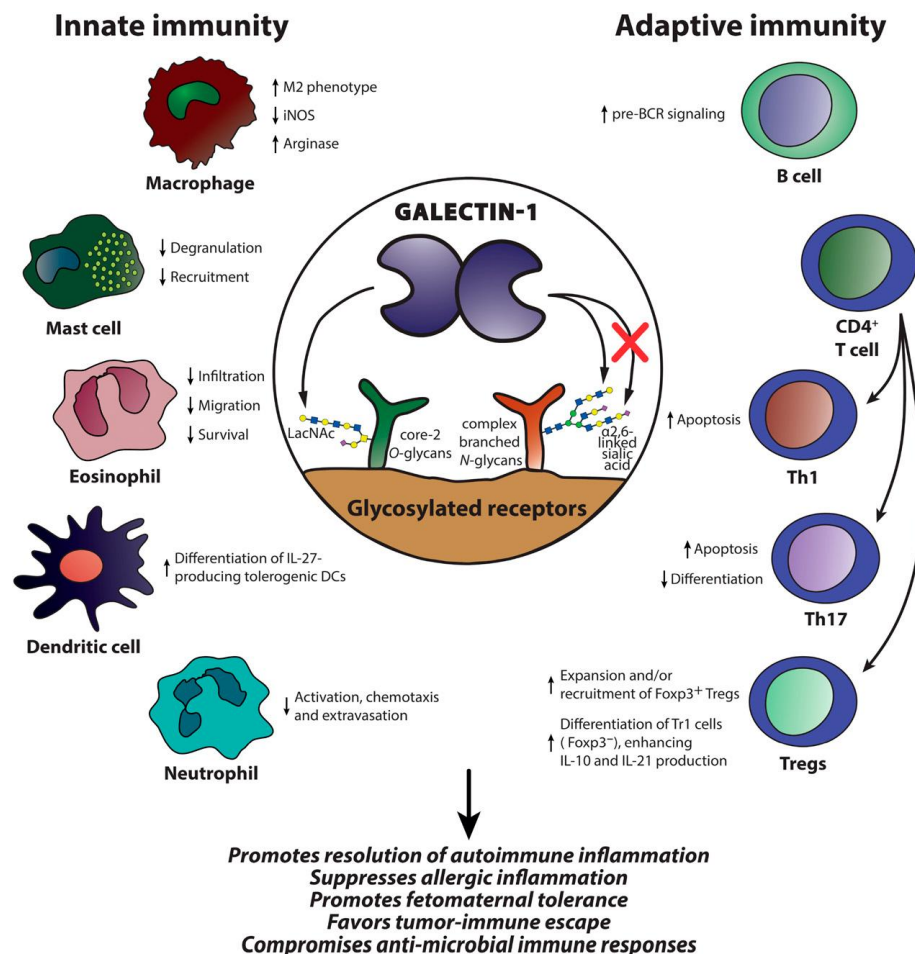
Diante dos dados abordados, o estudo da CA por meio de modelos experimentais representa uma ferramenta fundamental. Os modelos experimentais de alergia ocular têm sido desenvolvidos utilizando-se, principalmente, três espécies animais de laboratório (cobaia, rato e camundongo) imunizados com uma variedade 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).

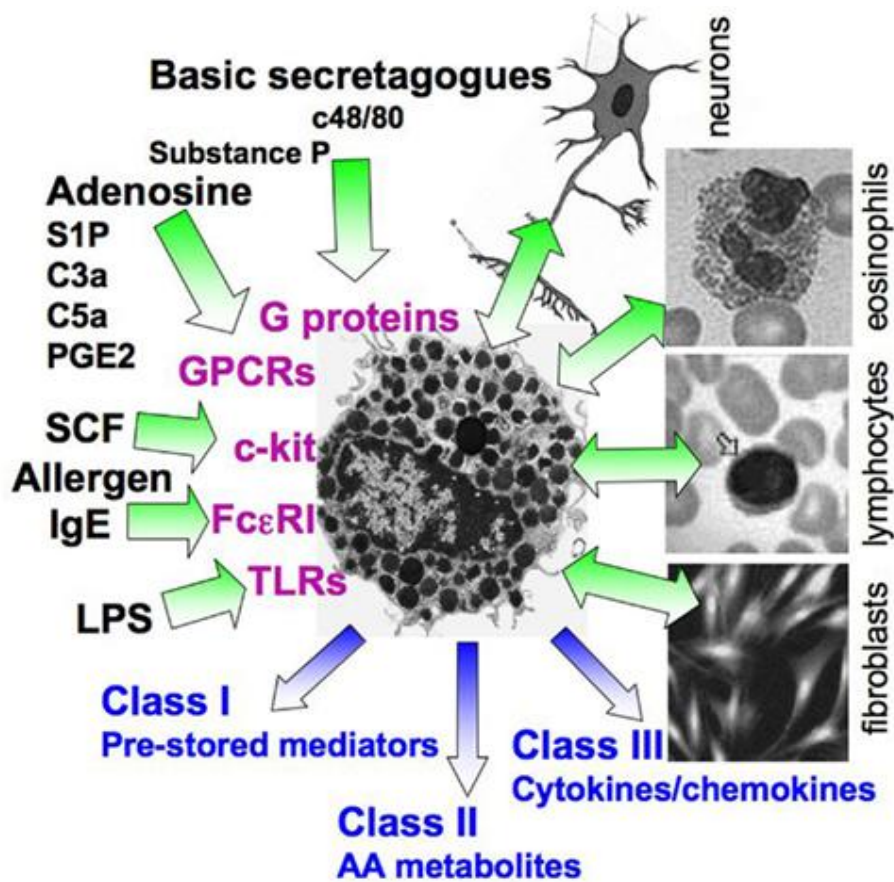
Os precursores dos mastócitos migram da circulação para os tecidos periféricos, onde se relacionam intimamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos periféricos e superfícies epiteliais (GALLI, GRIMBALDESTON; TSAI, 2008). Nesses locais, sob a influência do fator de células-tronco (SCF) e outras citocinas 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.



## 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  $\mu$ 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  $\mu$ g diminui a produção de **IL-4** nos olhos em relação ao C48/80 não tratado, enquanto na concentração de 0,3  $\mu$ 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.