

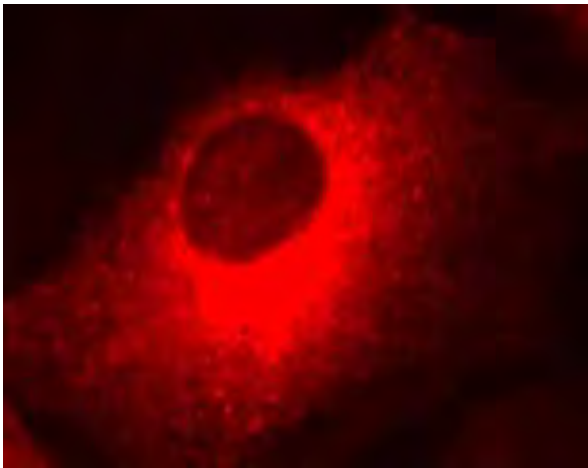
NATHÁLIA MARTINS SONEHARA

Avaliação do efeito inflamatório da proteína galectina-1 nas células
epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação por
endotoxina

**Dissertação apresentada para obtenção
do Título de Mestre em Genética.**

Nathália Martins Sonehara

Avaliação do efeito inflamatório da proteína galectina-1 nas células
epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação
por endotoxina



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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Maria Oliani
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Damas Gil

São José do Rio Preto
2013

Sonehara, Nathália Martins.

Avaliação do efeito inflamatório da proteína galectina-1 nas células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação por endotoxina/ Nathália Martins Sonehara. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

f. 78 : il. , 30 cm.

Orientador: Sonia Maria Oliani

Coorientador: Cristiane Damas Gil

Tese (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Anti-inflamatório. 2. Galectina-1 – Mecanismo de ação. 3. Proteína. 4. Uveíte. 5. Endotoxina. I. Oliani, Sonia Maria. II. Gil, Cristiane Damas. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.112

NATHÁLIA MARTINS SONEHARA

Avaliação do efeito inflamatório da proteína galectina-1 nas células
epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação
por endotoxina

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

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Eloisa Amália Vieira Ferro
UFU – Uberlândia

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
27/02/2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Milton e Sonia, meus maiores exemplos de vida, pelo apoio e amor incondicional, e por não terem medido esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, que, por sua integridade e sabedoria, é exemplo de mestre e, ao mesmo tempo, de pessoa por quem tenho e terei, sempre, imensa admiração e respeito. Meu agradecimento pela oportunidade, orientação e apoio prestado, permitindo meu crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Cristiane Damas Gil, mais que professora, uma grande amiga que interagiu em todas as fases deste trabalho e me trouxe cada vez mais experiência e amadurecimento pelas imprescindíveis sugestões e contribuições.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ Universal, processo 476136/2011-3) pelo auxílio concedido ao desenvolvimento dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2011/05248-5) pela bolsa de Mestrado concedida.

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

À querida amiga Thaís Santana Gastardelo, pessoa convicta, dedicada, esforçada, por quem tenho enorme carinho e por compartilhar vários momentos importantes.

Aos meus amigos Laila Toniol Cardin e Rubens de Paula Junior com quem compartilhei expectativas, angústias e conquistas em cada etapa desse trabalho.

Aos valiosos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Alexandre Dantas Gimenes, Aline Camargo Miranda, Ayla Blanco Poltronieri, Caroline de Freitas Zanon, Claudia de Mello Bosnich, Gabriela Franco Bueno, Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, Janesly Prates, Jéssica Zani Lacerda, Kallyne Kioko Mimura, Marina de Paula Silva, Marystela Fávero Oliveira, Poatan da Silva Pinoti, Rafaela Molás, uma equipe a qual é exemplo de trabalho com alegria e entusiasmo.

Às queridas Ana Paula Girol e Carla Patrícia Carlos, exemplos de integridade, profissionalismo e dedicação, pelo auxílio e ensinamentos prestados.

À Analice Andreoli da Silva, pelo companheirismo, atenção e auxílios constantes, que me ajudaram muito na realização desse trabalho.

Aos meus irmãos Eduardo Martins Sonehara e Guilherme Martins Sonehara, que mesmo longe sempre estiveram ao meu lado, compartilhando alegrias e dificuldades, representando para mim, a união nos momentos importantes.

Aos amigos de Pós-graduação Bruna Victorasso Jardim, Camila Leonel da Silva, Lívia Carvalho Ferreira, Juliana Ramos Lopes, Maysa Succi e Natália Maria Cândido, pelos momentos de alegria e companheirismo.

Aos meus familiares e demais amigos, pelo apoio e incentivo, que de uma ou de outra maneira deram crédito ao meu trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.” (Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A inflamação ocular é geralmente tratada com glicocorticoides, cujos efeitos colaterais estimulam novas estratégias terapêuticas. Nesse aspecto, destacamos a Galectina-1 (Gal-1), proteína com potencial anti-inflamatório, cuja ação em tecidos oculares foi pouco investigada. **Objetivo:** No presente estudo avaliamos a expressão da Gal-1 nas células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19), após ativação pelo inflamógeno lipopolissacarídeo (LPS) e tratamentos com a Gal-1 recombinante humana (hrGal-1). **Métodos:** Para avaliar o efeito anti-inflamatório da Gal-1, as células ARPE-19 foram cultivadas em meio DMEM:F-12 completo (controle), ativadas pelo LPS (10 µg/mL) e tratadas com hrGal-1 (0,04; 0,4 e 4 µg/mL) ou glicocorticoide dexametasona (Dex: 1µM), nos períodos de 2, 8, 24 e 48 horas. Nessas condições, avaliamos a citotoxicidade dos tratamentos farmacológicos por ensaios de viabilidade celular e, a expressão da Gal-1 endógena nas células ativadas pelo LPS e tratadas com Dex, por meio da imunocitoquímica ultraestrutural. Nos sobrenadantes, em todos os tempos experimentais, analisamos os níveis das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IL-1β e MCP-1 pelo método de ELISA. Com a finalidade de determinar a especificidade do efeito da hrGal-1, via domínio reconhecedor de carboidrato (CRD) sobre as células ARPE-19, adicionamos nas culturas os açúcares com ou sem afinidade pelo CRD (respectivamente β-galactose ou sucrose - 100mM) e, após 8 horas, os sobrenadantes foram coletados para análise das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8. Ainda, investigamos a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), um importante mediador do processo inflamatório, nos períodos de 8 e 24 horas, por imunofluorescência. **Resultados:** Os ensaios de viabilidade celular mostram que os diferentes tratamentos farmacológicos são de baixa citotoxicidade. As células, ativadas com LPS e tratadas com Dex, diminuem a expressão da Gal-1 endógena observada pelas análises imunocitoquímicas ultraestruturais, nos diferentes tempos experimentais. Após 2, 8 e 24 horas do estímulo inflamatório ocorre aumento da liberação de IL-6 e IL-8 pelas células em relação aos controles, enquanto o tratamento farmacológico com hrGal-1 (4 µg/mL) reduz, assim como a Dex, mas apenas em 8 e 24 horas. Em 48 horas, não observamos diferenças significantes de IL-6 e IL-8, mas diferentemente

ocorreu aumento dos níveis de MCP-1. Com relação às citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 β e MCP-1 detectamos baixos níveis nas diferentes condições experimentais. A adição dos açúcares β -galactose e sucrose na cultura celular não altera a atividade anti-inflamatória da hrGal-1 na produção das citocinas IL-6 e IL-8, sugerindo que nas células ARPE-19 o mecanismo de ação da Gal-1 é independente do CRD. O tratamento farmacológico com hrGal-1, após 8 e 24 horas do estímulo inflamatório, atua seletivamente na diminuição da expressão do mediador COX-2 e, somente após 24 horas com Dex. **Conclusão:** Em conjunto, os dados obtidos mostram a efetiva ação anti-inflamatória da Gal-1 sobre as células ARPE-19 quando submetidas à endotoxemia, e o seu potencial uso como uma alternativa terapêutica nas doenças inflamatórias oculares.

Palavras chaves: ciclo-oxigenase 2, citocinas, cultivo celular, endotoxemia, epitélio pigmentado da retina, inflamação, lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

Introduction: Ocular inflammation has often been treated with glucocorticoids, however, collateral side effects stimulate the search for new therapeutic strategies. In view of this, we emphasize on Galectin-1 (Gal-1), a protein with anti-inflammatory potential that has been poorly investigated in ocular tissues.

Aim: The aim of this paper is to evaluate the expression and mechanism of action of Gal-1 in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19 cells) activated by lipopolysaccharide (LPS) and treated with recombinant human Gal-1 (hrGal-1).

Methods: To assess the anti-inflammatory effect of Gal-1, ARPE-19 cells were cultured in DMEM: complete F-12 (control), activated by LPS and treated with hrGal-1 (0.04, 0.4 and 4 $\mu\text{g/ml}$) or glucocorticoid dexamethasone (Dex: 1 μM) at 2, 8, 24 and 48 hours. Under these conditions, we evaluated the cytotoxicity of pharmacological treatments by cell viability assays, and the expression of the endogenous Gal-1 in cells activated by LPS and treated with Dex by ultrastructural immunocytochemistry. In the supernatants of these cells, in all experimental periods, we analyzed the levels of IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IL-1 β and MCP-1 by ELISA. In order to determine the specificity of the effect of hrGal-1 via carbohydrate recognizer domain (CRD) on ARPE-19 cells, we added sugars to the culture with or without their affinity for the CRD (respectively β -galactose or sucrose - 100 mM), and these supernatants were collected after 8 hours for analysis of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. We also analyzed the expression of the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme, an important inflammatory process mediator, at 8 and 24 hours by immunofluorescence.

Results: The assays of cell viability show that the different drug treatments have low cytotoxicity. The cells activated with LPS and treated with Dex, decrease the expression of endogenous Gal-1 observed in the ultrastructural immunocytochemical analyses at the different experimental times. 2, 8 and 24 hours after the inflammatory stimulus there is an increase of IL-6 and IL-8 in the cells when compared to controls, whereas, pharmacological treatment with hrGal-1 at a concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$, reduces the levels of these cytokines, as well as the Dex, but only at 8 and 24 hours. At 48 hours, no significant differences were seen in IL-6 and IL-8, and IL-10, TNF- α and IL-1 β , but an increased level of MCP-1 was detected. The addition of β -galactose and

*sucrose sugars to the cell culture does not alter the anti-inflammatory activity of hrGal-1 in cytokine IL-6 and IL-8 production suggesting that in ARPE-19 cells the mechanism of action of Gal-1 is independent of its recognizer carbohydrate domain (CRD). Pharmacological treatment with hrGal-1, 8 and 24 hours after the inflammatory stimulus, acts selectively on decreased expression of the COX-2 mediator, and only after 24 hours with Dex. **Conclusion:** Taken together, the data obtained show the effective anti-inflammatory action of Gal-1 on ARPE-19 cells when subjected to endotoxemia, and its potential use as a therapeutic alternative in inflammatory ocular diseases.*

Keywords: *cyclooxygenase 2, cytokines, cell culture, endotoxemia, retinal pigment epithelium, inflammation, lipopolysaccharide.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. **Análises morfológicas das células ARPE-19..... 51**
- Figura 2. **Efeito dos tratamentos farmacológicos na viabilidade e proliferação das células ARPE-19..... 53**
- Figura 3. **Detecção imunocitoquímica ultraestrutural da localização subcelular da proteína Gal-1 endógena nas células ARPE-19 ativadas pelo LPS e tratadas ou não com dexametasona..... 55**
- Figura 4. **Efeito dos tratamentos com a proteína Gal-1 recombinante humana (hrGal-1) nos sobrenadantes das células ARPE-19 submetidas à endotoxemia..... 57**
- Figura 5. **Papel do domínio reconhecedor de carboidrato (CRD) da Gal-1 na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 nos sobrenadantes das células ARPE-19..... 59**
- Figura 6. **Análise da proteína Gal-1 sobre a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) nas células ARPE-19 previamente submetidas à endotoxemia por 8 horas por meio da imunofluorescência..... 61**
- Figura 7. **Análise da proteína Gal-1 sobre a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) nas células ARPE-19 previamente submetidas à endotoxemia por 24 horas por meio da imunofluorescência..... 63**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
μ	Micro
μg	Microgramas
μm	Micrômetros
β	Beta
~	Aproximadamente
±	Média
<	Menor
-	Menos
ANOVA	Análise de variância
ARPE-19	Linhagem de células epiteliais pigmentadas da retina humana
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Marcador celular presente na membrana da célula
CL⁻	Cloreto
cLPS	Lipopolissacarídeo de <i>Clamydia pneumoniae</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CRD	Domínio reconhecedor de carboidrato
Dex	Dexametasona
DMEM	Meio <i>Dulbecco Eagle</i> modificado
DMRI	Degeneração macular relacionada com a idade
EPR:	Epitélio pigmentado da retina
Gal-1	Galectina-1

GC	Glicocorticoide
HAM-F12	Nutriente <i>HAM-12</i>
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
hrGal-1	Galectina-1 recombinante humana
H₂O	Água
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
m	Mili
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MV	Microvilosidades
n	Número de células
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OS	Segmento externo dos fotorreceptores
PBEA	PBS contendo 1% de albumina de ovo de galinha
PBS	Tampão fosfato salina
PEDF	Fator derivado do epitélio pigmentado
pg	Picogramas

pH	Potencial Hidrogeniônico
rhGal-1	Galectina-1 recombinante humana
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
S.E.M.	<i>Standard error of mean</i> = Erro padrão da média
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
Th1	Linfócito T auxiliar de resposta tipo 1
TLRs	Receptores toll-like
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	28
2.1. <i>Objetivo geral</i>	29
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. <i>Cultivo da linhagem celular ARPE-19</i>	31
3.2. <i>Tratamentos farmacológicos: endotoxemia , Galectina-1 recombinante humana (hrGal-1) e dexametasona (Dex)</i>	31
3.3. <i>Análise da viabilidade celular</i>	32
3.4. <i>Análises morfológicas das células ARPE-19</i>	32
3.4.1. <i>Análise celular pela microscopia de contraste de fase</i>	32
3.4.2. <i>Avaliação celular pelas microscopias de luz e eletrônica de transmissão: fixação, processamento e inclusão</i>	33
3.5. <i>Imunocitoquímica ultraestrutural: expressão endógena da Gal-1 nas células ARPE-19</i>	33
3.6. <i>Análise quantitativa dos níveis das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, MCP-1 e IL-1β nos sobrenadantes pelo método de ELISA</i>	34
3.7. <i>Análise da enzima ciclo-oxigenase 2 por imunofluorescência</i>	35
3.8. <i>Análises estatísticas</i>	35
4. RESULTADOS	36
4.1. <i>Análises morfológicas das células ARPE-19</i>	37
4.2. <i>Efeitos dos tratamentos farmacológicos sobre a viabilidade das células ARPE-19</i>	37
4.3. <i>Expressão endógena da proteína galectina-1 nas células ativadas pelo LPS e pós-tratadas com dexametasona</i>	37
4.4. <i>Análise dos níveis de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células ARPE-19 submetidas à endotoxina e tratadas com hrGal-1 e dexametasona</i>	38
4.5. <i>Papel do domínio reconhecedor de carboidrato (CRD) da Gal-1 na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8</i>	39
4.6. <i>Expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) nas células ARPE-19</i>	39

5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES.....	47
7. FIGURAS	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9. ANEXO.....	76

1. INTRODUÇÃO

O olho é um órgão privilegiado imunologicamente por possuir uma combinação anatômica, mecânica e imunológica de mecanismos de defesa, onde respostas inflamatórias podem ser suprimidas (LAMBIASE et al., 2011). A presença de uma barreira hemato-retiniana (CAI; BRANDT, 2008) é um dos mecanismos de defesa capaz de isolar esse tecido de inúmeros fatores imunes transportados pela circulação sanguínea (LEUNG; BARNSTABLE; TOMBRAN-TINK, 2009). Uma representação esquemática da estrutura do olho e, em detalhes da retina, é mostrada na Figura 1.

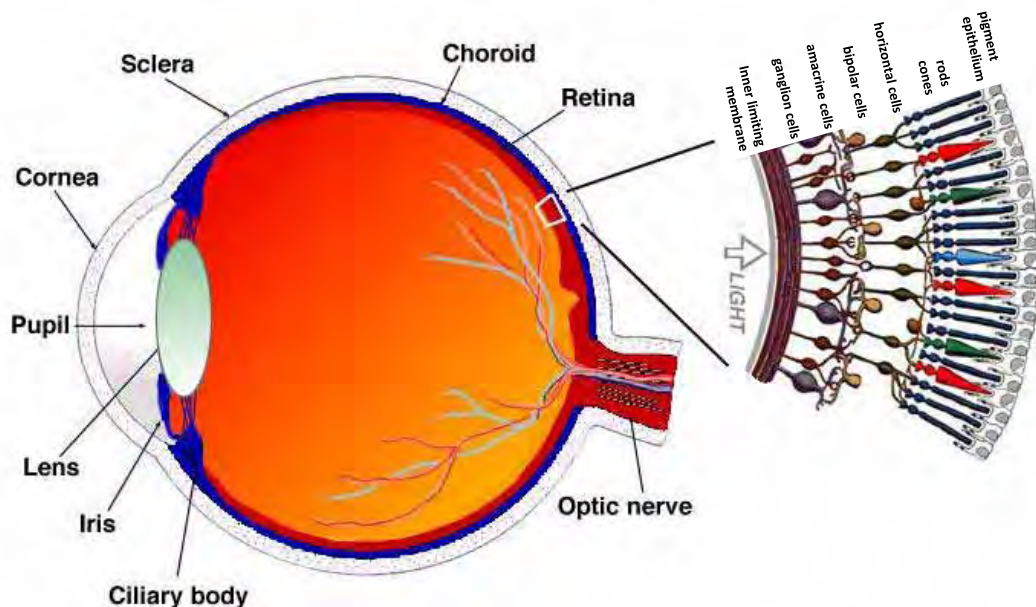


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do olho, destacando as camadas da retina. Figura retirada de <http://webvision.med.utah.edu/sretina.html>.

A retina é uma camada fina e delicada, formada pela retina sensorial, constituída pelos cones, bastonetes e redes neuronais complexas, e pelo epitélio pigmentado da retina (EPR) (Figura 2). Essas camadas são responsáveis pela codificação de luz em sinais neuronais para a visão, um processo denominado fototransdução (JOHN et al., 2000; MUSTAFI; ENGEL; PALCZEWSKI, 2009; TANG et al., 2013).

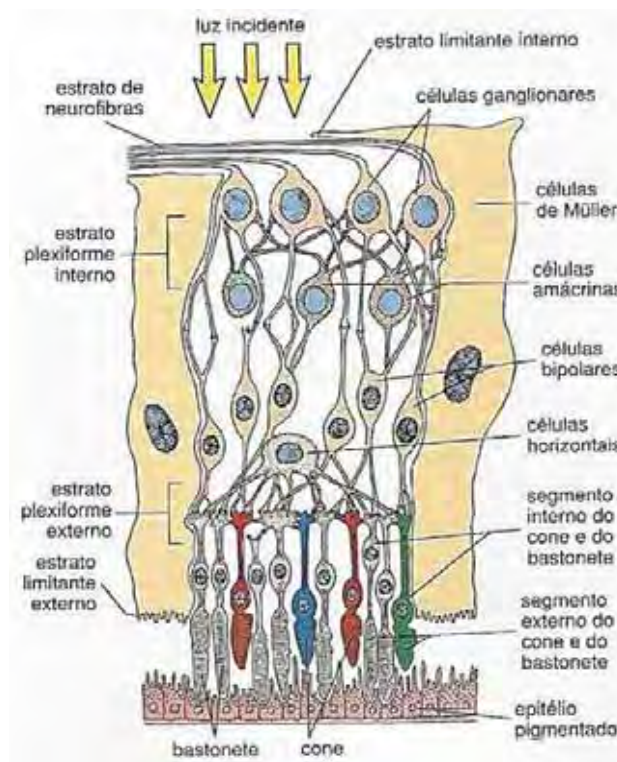


Figura 2. Desenho esquemático das camadas da retina. A luz entra na retina e atravessa suas camadas internas antes de alcançar os fotorreceptores dos bastonetes e cones que estão associados ao epitélio pigmentado (ROSS; PAWLINA, 2007).

O epitélio pigmentado da retina é o principal componente da barreira hemato-retiniana (LEUNG; BARNSTABLE; TOMBRAN-TINK, 2009), com importante papel na manutenção da fisiologia, ciclo visual, nutrição e tolerância imune do olho (STREILEIN, 2003; DWYER et al., 2011). Esse epitélio está localizado entre a corioide e retina sensorial, sendo constituído por uma monocamada externa, composta de células cúbicas contendo melanina. Essas células são aderidas à superfície interna da membrana de Bruch, diretamente posicionada sobre os segmentos externos dos fotorreceptores e interconectada por complexos juncionais que consistem em junções *gap*, oclusão e desmossomos (KOEVARY, 2000; DWYER et al., 2011; LEE; MACLAREN, 2011; LIPINSKI; THAKE; MACLAREN, 2013).

As células epiteliais pigmentadas da retina (EPR) têm as funções físicas, ópticas, metabólicas, bioquímicas e de transporte, exercendo importante papel na visão normal e mantendo a homeostase da retina. Entre esses papéis destacamos a absorção e concentração da luz dentro do olho, melhorando a resolução da imagem

e manutenção da adesão da retina neurosensorial. Ainda, essas células formam uma barreira de permeabilidade seletiva entre a corioide e a retina neurosensorial, e participam das funções como: ciclo visual, fagocitose dos cones e bastonetes, síntese de matriz interfotoreceptor e, transporte de íons, água, metabólitos e nutrientes (principalmente vitamina A) (FORRESTER et al., 1999; STRAUSS, 2005; DWYER et al., 2011). Algumas das principais funções do epitélio pigmentado da retina humana estão esquematizadas na Figura 3.

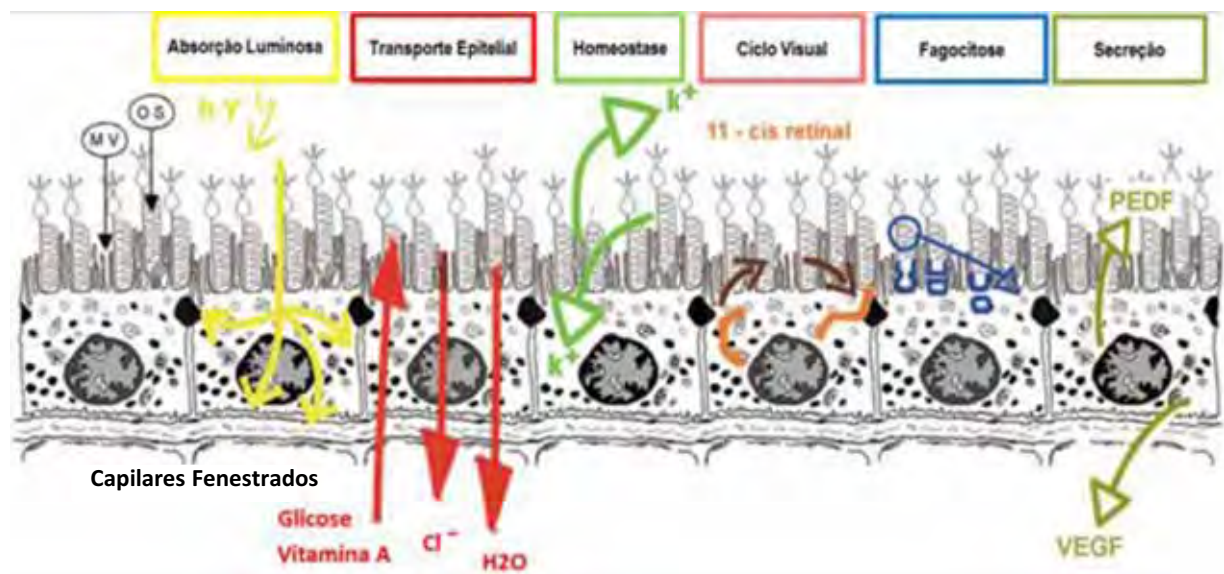


Figura 3. Representação esquemática das principais funções das células epiteliais pigmentadas da retina humana. Abreviações: M.V., Microvilosidades; O.S., Segmento externo dos fotorreceptores; PEDF: Fator derivado do epitélio pigmentado; VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular (Modificado de Strauss 2005).

As células EPR secretam uma série de fatores de crescimento e imunossupressores que ajudam na manutenção da integridade estrutural do endotélio coriocapilar e dos fotorreceptores, auxiliando no estabelecimento do privilégio imune do olho (STREILEIN, 2003; MOCHIZUKI, SUGITA; KAMOI, 2012).

Com todas as características multifuncionais das células EPR descritas, a falha de qualquer uma dessas funções pode provocar a degeneração da retina, perda gradual da acuidade visual e, até mesmo, cegueira (DWYER et al., 2011).

O EPR suporta alto nível de estresse oxidativo devido ao elevado consumo de oxigênio e alto teor lipídico poli-insaturado e ampla exposição à luz (PAIMELA et al., 2007). O estresse oxidativo pode originar um progressivo dano a essas células que,

secundariamente, causa efeitos adversos nos fotorreceptores (ZARBIN, 2004). Além do estresse oxidativo crônico, os processos inflamatórios também têm sido ligados à degeneração da retina (ZARBIN, 2004). O estímulo dos receptores *toll-like* (TLRs) induz uma série de respostas inflamatórias e antimicrobianas, marcado pela ativação celular e liberação de citocinas (HOPKINS; SRISKANDAN, 2005; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

A endotoxemia pode provocar inflamação ocular aguda e, conseqüentemente, induz ao processo de uveíte, com vários graus de degeneração na retina e perda da visão (SHEN et al., 2000; AGRAWAL et al., 2010). Essa inflamação, caracterizada pelo acúmulo de leucócitos nos tecidos oculares, pode afetar qualquer parte do olho, sendo um processo doloroso e associado à fotofobia (BANSAL; GUPTA; GUPTA, 2010). A natureza recorrente desse processo inflamatório pode resultar em complicações secundárias como catarata, glaucoma, descolamento de retina e, por fim, destruição dos tecidos oculares e cegueira (JANCEVSKI; FOSTER, 2010; SRIVASTAVA; RAJAPPA; KAUR, 2010).

A uveíte pode ser causada por organismos infecciosos ou processos imunomediados, entre os quais, a doença de Behçet, espondilite anquilosante, síndrome de Reiter e artrite reumatóide juvenil (HEILIGENHAUS et al., 2010). A literatura mostra que alguns lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos desencadeiam resposta inflamatória em humanos e aumentam os níveis de interleucinas (IL) 1, 2, 4, 8, a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (CHIN et al., 2001), o fator de necrose tumoral α (TNF- α), e o interferon γ (IFN- γ) (AZHANI; MILLER; PETERSON, 2000). Bactérias gram-negativas na circulação sanguínea podem provocar sepse metastática no olho (CHIU et al., 2007), condição que acomete aproximadamente 32-37% dos casos de endoftalmite endógena no ocidente e 70% nos países orientais (JACKSON et al., 2003). O LPS de bactérias gram-positivas e negativas, incluindo *S. aureus* e *E. coli*, pode induzir patologias na retina, como hemorragia retiniana (CELIK et al., 2006), enquanto a *Chlamydia pneumoniae* (cLPS) pode apresentar correlação com a progressão da degeneração macular relacionada com a idade (ROBMAN et al., 2005).

Na retina, o LPS aumenta a concentração de citocinas pró-inflamatórias, sendo também um potente desencadeador da ativação da micróglia (WANG et al., 2005; YANG; ZHU; TSO, 2007) e astrócitos no tecido nervoso, (JANG et al., 2007). Essa endotoxina pode estimular diretamente as células EPR nas concentrações

entre 100 ng/mL e 1 mg/mL, produzindo respostas inflamatórias e sinais apoptóticos (GARCÍA-CABANES et al., 2001; KOGA et al., 2003; ELNER et al., 2005). Ainda, as células EPR expressam vários receptores de LPS, incluindo CD14 e o receptor *toll-like* 4 (TLR4) que apresentam importantes papéis na resposta imune em diferentes afecções oculares (ELNER et al., 2005; PAIMELA et al., 2007; LAMBIASE et al., 2011).

Alguns fatores secretados pelas células EPR podem inibir diretamente a imunidade inata e adaptativa (TAYLOR; YEE, 2003; KAESTEL et al., 2005). O fator de crescimento transformante α (TGF- α) e a trombospondina, ambos secretados pelas células EPR, podem bloquear a ativação da célula Th1 e promover tolerância sistêmica de antígenos no microambiente ocular (ZAMIRI et al., 2005; UNO et al., 2006). Essas células podem ainda regular a imunidade inata pela supressão da inflamação induzida por macrófagos, por meio da secreção de fatores derivados do epitélio pigmentado (PEDF), um polipeptídeo que aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e reduz a expressão da citocina pró-inflamatória IL-12 pelos macrófagos (ZAMIRI et al., 2006). As células EPR secretam outros imunomoduladores, incluindo IFN- γ , IL-6 e IL-8 em resposta a outras citocinas (HOOKS et al., 2008; QIN; NI; DE VRIES, 2008). Esses estudos indicam que as células EPR exercem um papel fundamental nos processos inflamatórios da retina (LEUNG; BARNSTABLE; TROMBAN-TINK, 2009).

Na inflamação ocular, o EPR tem um efeito imunossupressor sobre a proliferação de linfócitos, por meio da produção de prostaglandina (LIVERSIDGE et al., 1993; TEDESCO et al., 2004). Ainda, essas células são capazes de expressar o complexo principal de histocompatibilidade classe II, uma importante molécula imunorregulatória, que pode apresentar antígenos às células T (TEDESCO et al., 2004) e produzir TGF- β bioativo que é, em parte, responsável pela ativação dos macrófagos. A interação entre essas células parece ser um importante fator nos processos inflamatórios, imunológicos e de cicatrização, provavelmente envolvidos na proliferação vítreo-retiniana.

A inflamação, sendo o principal fator contribuinte para inúmeras desordens oculares (LEUNG; BARNSTABLE; TROMBAN-TINK, 2009), tem os glicocorticoide (GC) como medicamentos frequentemente administrados nos processos intra-oculares (YEUNG et al., 2003; HUANG; GLASS, 2010; RAJPAL et al., 2011). No entanto, o uso desses fármacos é limitado devido aos seus efeitos colaterais, como

o aumento da pressão ocular, citotoxicidade e catarata (EDELMAN, 2010; HEILIGENHAUS et al., 2010; LEE; FOSTER, 2010; ROSENBAUM, 2010; SRIVASTAVA; RAJAPPA; KAUR, 2010; RAJPAL et al., 2011). Além disso, os GC não devem ser administrados em pacientes infectados com HIV, com transplantes ou outras terapias imunossupressoras (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). A galectina-1 (Gal-1), proteína com peso molecular de 14,5 KDa, é um dos mediadores endógenos que têm sido investigado como um agente terapêutico anti-inflamatório.

As galectinas pertencem a uma família de proteínas caracterizada por possuir afinidade aos β -galactosídeos e pela apresentação de uma sequência conservada de 135 aminoácidos no domínio reconhecedor de carboidrato – CRD (LEFFLER et al., 2004). Várias funções têm sido atribuídas para as galectinas, que incluem: adesão celular, regulação do crescimento celular, embriogênese, metástase, *splicing* do pré-RNA, imunomodulação, inflamação e apoptose (RABINOVICH; RUBINSTEIN; FAINBOIN, 2002; COOPER et al., 2010; LIU; RABINOVICH, 2010; COOPER et al., 2012). Em mamíferos, 15 membros dessa família foram descritos e clonados (RABINOVICH et al., 2004; LIU, 2005; LE MERCIER et al., 2010). Com base na organização estrutural, Hirabayashi e Kasai (1993) classificaram as galectinas em três subfamílias: *Proto-*, *Tandem repeat* e *Chimera types*. 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), possuindo um CRD e um domínio amino terminal 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 (RABINOVICH; CROCI, 2012). Uma apresentação esquemática da estrutura das subfamílias das galectinas está reproduzida na Figura 4.

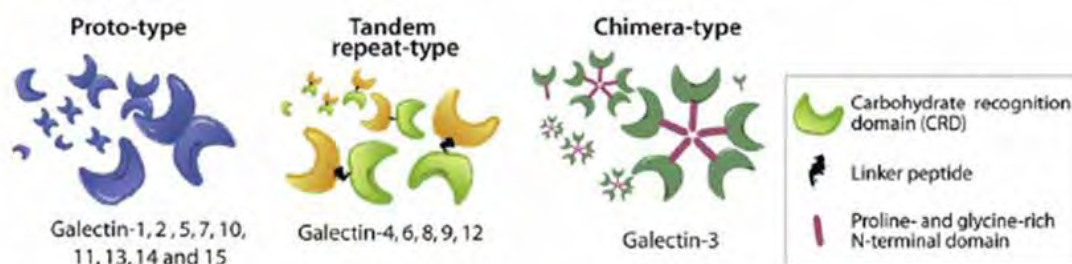


Figura 4. Subdivisão das galectinas baseada em sua organização estrutural. (Figura modificada de Rabinovich e Croci, Immunity, 2012).

A expressão da Gal-1 foi observada em várias células relacionadas com a resposta inflamatória, especialmente neutrófilos, mastócitos (GIL et al., 2006a; GIL et al., 2006b), macrófagos (RABINOVICH et al., 1998), linfócitos T e B (BLASER et al., 1998; ZUÑIGA et al., 2001) e células endoteliais (LA et al., 2003; GIL et al., 2006a; GIL et al., 2006b), sugerindo um importante papel na geração e manutenção da tolerância imunológica. A expressão, secreção e distribuição celular dessa proteína são altamente susceptíveis à modulação por diferentes estímulos inflamatórios, como por exemplo, peptídeos quimiotáticos, lipopolissacarídeos (LPS), fator- α de necrose tumoral (TNF- α) e carragenina (RABINOVICH et al., 2002; GIL et al., 2006a).

As propriedades anti-inflamatórias da Gal-1 foram avaliadas em vários modelos de inflamação crônica e auto-imunidade, incluindo uveíte, encefalomielite autoimune, artrite, hepatite e diabetes (RABINOVICH et al., 1999a; SANTUCCI et al., 2000; TOSCANO et al., 2006; HOKAMA; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2008). Essa proteína participa da interação da superfície celular com a matriz extracelular por meio de ligações a proteínas glicoconjugadas (BARONDES et al., 1994). A Gal-1 foi encontrada no epitélio pigmentado da retina, na membrana limitante externa e camada plexiforme externa em retinas bovinas e murinas (UEHARA; OHBA; OZAWA, 2001), podendo estar envolvida na adesão das camadas externas de fotorreceptores e plexiforme por meio da interação do seu CRD com resíduos de β -galactosídeos na matriz entre os fotorreceptores.

A presença da Gal-1 na matriz extracelular das membranas epirretinianas, na vitreorretinopatia proliferativa, foi mostrada por Alge e colaboradores (2006). Esses pesquisadores propuseram que a migração do epitélio pigmentado da retina, induzido pelo fator de crescimento do hepatócito (HGF), pode ser dependente, ao menos em parte, da Gal-1 e dos seus mecanismos de ação galactosídeo-dependentes.

A ação inibitória da Gal-1 exógena, no recrutamento leucocitário, foi avaliada em uma série de condições *in vivo* e *in vitro* (RABINOVICH et al., 2000; LA et al., 2003; GIL; GULLO; OLIANI, 2010). No nosso laboratório avaliamos a expressão dessa proteína em células endoteliais e neutrófilos humanos durante o processo de transmigração induzido por IL-8 (GIL et al., 2006b). Os resultados obtidos sugeriram que as pequenas quantidades de Gal-1 endógena, encontradas nos neutrófilos transmigrados, indicam um processo de secreção. Resultados semelhantes também

foram observados na migração de neutrófilos *in vivo*, em modelo de peritonite em ratos (GIL et al., 2006a).

A ocorrência de anticorpos circulantes anti-Gal-1, no soro de pacientes com uveíte auto-imune e infecciosa, foi investigada por Romero et al., (2006). Esses pesquisadores mostraram a associação dos anticorpos anti-Gal-1 com a progressão da doença ocular. A administração sistêmica de Gal-1 recombinante (rGal-1), na uveíte auto-imune experimental, foi investigada por Toscano et al., (2006), os quais concluíram que o tratamento com a rGal-1 resultou na redução da infiltração leucocitária e inibição da imunidade mediada por células T.

Diante dessas considerações, e da necessidade de novas terapias para o tratamento das inflamações oculares em substituição às atuais, como por exemplo, os corticosteroides que apresentam efeitos adversos (DUNN, 2004), nós investigamos, *in vitro*, a expressão e localização da proteína Gal-1 nas células epiteliais pigmentadas da retina humana após ativação pelo inflamógeno LPS, bem como o efeito da administração da Gal-1 nessas células, em busca de uma alternativa terapêutica ocular inovadora.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Em função da importância no entendimento do potencial anti-inflamatório da galectina-1 (Gal-1) na interação com o epitélio pigmentado da retina, o objetivo geral das nossas investigações foi avaliar, *in vitro*, essa proteína endógena após ativação pelo inflamógeno lipopolissacarídeo (LPS) e administração da Gal-1 recombinante humana (hrGal-1) na linhagem de células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19).

2.2. Objetivos específicos

Nas células ARPE-19, preservadas no meio de cultura controle, após ativação com LPS e tratamentos com hrGal-1 ou dexametasona (Dex), nos períodos de 0, 2, 8, 24 e 48 horas, foram analisadas os seguintes aspectos:

- i) a morfologia após os diferentes tempos e condições experimentais, pela microscopia de luz;
- ii) a citotoxicidade dos tratamentos farmacológicos por meio dos ensaios de viabilidade celular;
- iii) a expressão e localização da Gal-1 endógena nas células controle, ativadas pelo LPS e LPS/Dex, por meio da reação de imunocitoquímica ultraestrutural;
- iv) as dosagens das citocinas, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IL-1 β e MCP-1 nos sobrenadantes das células nas diferentes condições experimentais, pelo método de ELISA;
- v) o efeito anti-inflamatório da Gal-1 pela utilização de hrGal-1 nas dosagens de 0,04; 0,4 e 4 $\mu\text{g/mL}$;
- vi) a ação da Gal-1 nas dosagens das citocinas, pela adição na cultura dos açúcares com ou sem afinidade pelo seu domínio reconhecedor de carboidrato (CRD), respectivamente β -galactose e sucrose, pelo método de ELISA;
- vii) a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), nas células em todas as condições experimentais, pelo método de imunofluorescência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP (Parecer 041/11), cujo estudo foi dispensado de acompanhamento pelo Comitê por envolver apenas linhagem celular (Anexo).

3.1. Cultivo da linhagem celular ARPE-19

A célula ARPE-19 (derivada do epitélio pigmentado da retina de olho humano normal) (*American Type Culture Collection – ATCC*), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, constitui uma linhagem celular que reuniu as melhores condições técnicas para o desenvolvimento desse projeto. Essas células foram cultivadas em uma mistura (1:1) de meio *Dulbecco Eagle* modificado e Ham F-12 (DMEM:F-12) (Cultilab, Br), de acordo com Dunn et al., (1996). A concentração usada foi de 10^4 células/35mm por amostra, contendo meio DMEM:F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Br), 200 mM L-glutamina, 0,1 mg/mL de streptomina e 100 U/mL de penicilina (*Invitrogen, UK*). As células foram submetidas às seguintes condições experimentais: cultivadas em meio completo (controle), ativadas pelo lipopolissacarídeo (LPS), ativadas e tratadas com Galectina-1 recombinante humana (LPS/hrGal-1) e com o glicocorticoide dexametasona (LPS/Dex) e somente tratadas com dexametasona (Dex).

3.2. Tratamentos farmacológicos: endotoxemia, Galectina-1 recombinante humana (hrGal-1) e dexametasona (Dex)

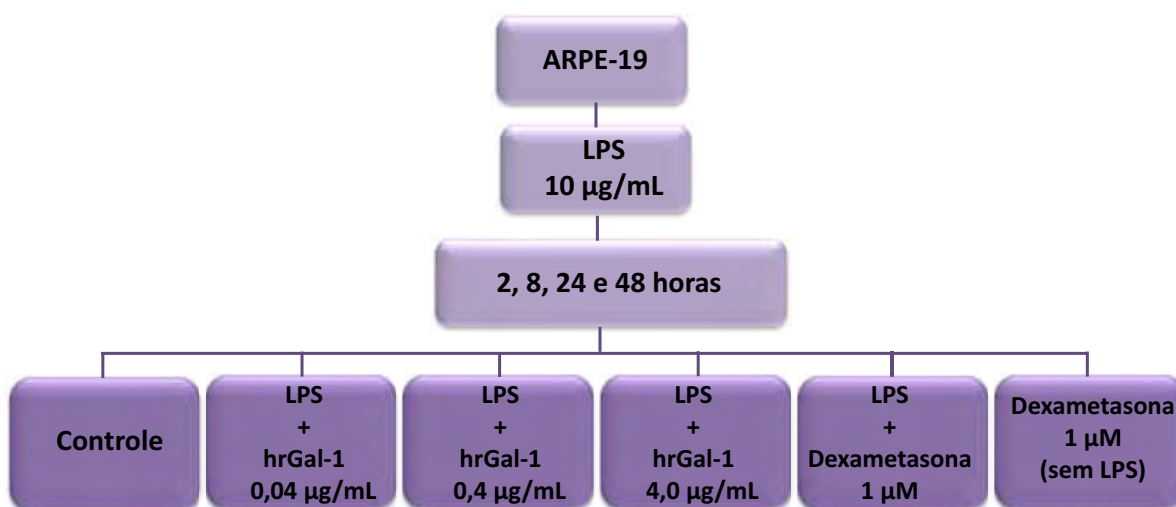
Com o objetivo de determinar a melhor dose para o tratamento com a proteína Galectina-1 e o melhor tempo experimental, as células ARPE-19 foram inicialmente cultivadas em meio completo, como descrito no item anterior e, após ativadas pelo lipopolissacarídeo (LPS, tipo *Escherichia coli*, sorotipo 0127: B8, *Sigma Chemical Co. Poole, Dorset, UK*) na concentração de 10 µg/mL (MIMURA, 2012).

Para verificar o efeito anti-inflamatório da Gal-1 recombinante humana (hrGal-1) após ativação das células com LPS (*Peptotech, EC Ltd, London, UK*), testamos

as concentrações de 0,04; 0,4 e 4 µg/mL (~2,7 nmol/L a 0,27 µmol/L) (RABINOVICH et al., 1999a; LA et al., 2003).

Como controle da ação anti-inflamatória da Gal-1 nas células ativadas com LPS utilizamos o glicocorticoide dexametasona (Dex) (*Sigma-Aldrich*), na concentração de 1 µM (CHANG; CHOU; YU, 2010).

As investigações com as células ARPE-19, ativadas pelo LPS, tratadas ou não com hrGal-1 e Dex foram realizadas nos tempos de 2, 8, 24 e 48 horas conforme o esquema abaixo.



3.3. Análise da viabilidade celular

A análise da viabilidade celular foi realizada com células tratadas de acordo com os ensaios descrito no item 3.1 e, após, tripsinizadas, coradas na proporção de 1:1 (10 µL de amostra e 10 µL de *Trypan Blue*) e quantificadas no contador de células *Countess Automated Cell Counter* (*Invitrogen, UK*).

3.4. Análises morfológicas das células ARPE-19

3.4.1. Análise celular pela microscopia de contraste de fase

A morfologia celular foi analisada nas diferentes condições experimentais no microscópio invertido *OLYMPUS, CKX41*, do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto – SP.

3.4.2. Avaliação celular pelas microscopias de luz e eletrônica de transmissão: fixação, processamento e inclusão

As células foram fixadas em glutaraldeído a 0,5% e paraformaldeído a 4%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.4 por 24 horas, a 4°C. Em seguida, foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em série crescente de metanol (*Merck-Germany*) e pré-incluídas em mistura de metanol a 100% e resina *LRGold* (*London Resin Co., Reading, Berkshire, UK*), em partes iguais, durante 24 horas, a -20°C. Após, foram incluídas na resina *LRGold* pura por 24 horas, a -20°C e, expostas à luz ultravioleta (OLIANI et al., 2001).

Cortes de 1 µm foram obtidos no micrótomo (*Reichert Ultracut; Leica, Áustria*) para as análises morfológicas. Posteriormente, as células foram coradas com azul de toluidina a 1%, em solução de bórax 1% (*TAAB Laboratories, Aldermaston, UK*). As fotomicrografias foram obtidas no microscópio *ZEISS AXIOSKOP 2*, do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

Para as análises imunocitoquímicas ultraestruturais das células, cortes de aproximadamente 50 nm foram obtidos no ultramicrótomo (*Reichert Ultracut; Leica, Áustria*) e coletados em telas de níquel para as análises imunocitoquímicas.

3.5. Imunocitoquímica ultraestrutural: expressão endógena da Gal-1 nas células ARPE-19

A reação imunocitoquímica foi usada para detectar, em nível subcelular, a expressão da Gal-1 nas células ARPE-19 controle, tratadas com LPS e LPS/Dex. Para a detecção dessa proteína, cortes ultrafinos (~50 nm) foram preparados e incubados de acordo com os seguintes procedimentos: (a) duas lavagens (5 minutos cada) em tampão fosfato salina a 0,1 M (PBS) contendo ovoalbumina a 1% (PBEA); (b) bloqueio em PBEA a 5% por 30 minutos; (c) monitoramento da reatividade da Gal-1 pelo anticorpo policlonal *rabbit anti-Gal-1* (*Zymed, Invitrogen, UK*), na diluição 1:100, em PBEA a 1%, por 2 horas; (d) após três lavagens (5 minutos cada) com PBEA a 1%, o anticorpo secundário *goat anti-rabbit* conjugado com partículas de ouro coloidal de 15 nm (*British BioCell International, Cardiff, UK*), foi adicionado (1:50 em PBEA a 1%), e mantido por 1 hora; (e) três lavagens (5 minutos cada) com

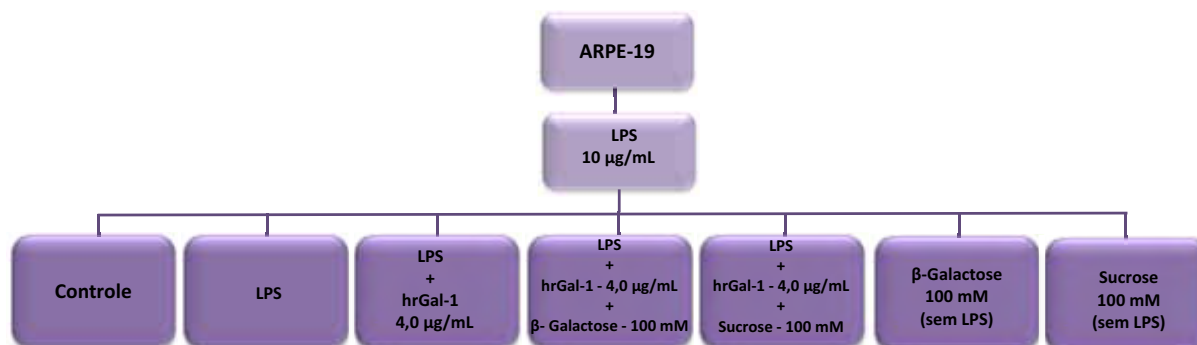
PBEA a 1% e, em água destilada (três lavagens de 1 minuto). No controle da reação o anticorpo primário foi suprimido e usado apenas PBEA a 1%.

Após, os cortes ultrafinos foram contrastados por 15 minutos em acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM900, do Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP, São Paulo, SP.

3.6. Análise quantitativa dos níveis das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1 e IL-1 β nos sobrenadantes pelo método de ELISA

As citocinas IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1 e IL-1 β foram avaliadas nos sobrenadantes das células ARPE-19 pelo método de ELISA, por meio de kits de imuno-ensaio disponíveis comercialmente (*BD Pharmigen, San Diego, USA; R&D, Minneapolis, Minneapolis, USA*) com limite de detecção de 5000 pg/mL, de acordo com as instruções dos fabricantes. As concentrações das citocinas foram determinadas por um leitor de densidade óptica (*Molecular Devices Sunnyvale, CA*), utilizando curvas padrões. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.) das concentrações de citocinas (pg/mL) e todas as estimativas realizadas em triplicata. Nas condições experimentais descritas no item 3.2 avaliamos as referidas citocinas.

Para determinar se a atividade anti-inflamatória da Gal-1 nas células ARPE-19 estava associada ao seu domínio reconhecedor de carboidrato (CRD), repetimos os ensaios no tempo experimental escolhido de 8 horas, analisando as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8. Os açúcares com ou sem afinidade pelo CRD, respectivamente, β -galactose e sucrose, foram adicionados no tratamento farmacológico com a hrGal-1 (4 μ g/mL), de acordo com o esquema abaixo.



3.7. Análise da enzima ciclo-oxigenase 2 por imunofluorescência

Para detectar a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), as células ARPE-19 foram cultivadas em lamínulas, fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas e, posteriormente, incubadas com os seguintes reagentes à temperatura ambiente: (a) lavadas três vezes com PBS por 15 minutos; (b) lavadas com polioxietilenosorbitano monolaurato (*Tween 20*) (Sigma) a 0,4%, diluído em PBS, por 15 minutos; (c) bloqueio por albumina sérica bovina (BSA) a 1%, diluída em PBS com soro normal de *goat* a 3%, por 1 hora; (d) incubadas com anticorpo policlonal *rabbit anti-COX-2* (*Abcam, Cambridge, UK*), diluição 1:200 em PBS, a 1,5% de soro normal de *goat*; (e) lavadas três vezes com PBS por 15 minutos; (f) incubadas com anticorpo fluorescente *FITC anti-rabbit IgG*, (*Serotec, Oxford, UK*), diluição 1:100 em PBS a 1,5% de soro normal de *goat*, durante 1 hora; (g) lavadas três vezes em PBS, por 5 minutos e, posteriormente, as lâminas, contendo as células, foram montadas com uma solução de glicerol e PBS (1:1). Em células foram analisadas com o filtro de comprimento de onda 546 nm, no microscópio *ZEISS – AXIOSKOP 2* do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE/UNESP. A enzima foi quantificada por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) pelo analisador de imagens, utilizando o *Software AXIVISION*. Nos controles da reação utilizamos soro normal de *goat*.

3.8. Análises estatísticas

As diferenças estatísticas na expressão da Gal-1 endógena (quantificação das partículas de ouro na imunocitoquímica ultraestrutural) e na dosagem de citocinas foram comparadas pela ANOVA, seguidas, se significantes, pelo teste de Bonferroni e teste *t* de *Student*. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Análises morfológicas das células ARPE-19

Inicialmente, nas células ARPE-19, cultivadas e analisadas no microscópio de luz invertido de contraste de fase, observamos prolongamentos e grânulos citoplasmáticos (Figura 1a). Na microscopia de luz, essas células apresentaram os núcleos em geral deslocados para um dos polos, volumosos, eucromáticos e com nucléolo evidente, caracterizando uma célula com alta atividade metabólica (Figura 1b).

4.2. Efeitos dos tratamentos farmacológicos sobre a viabilidade das células ARPE-19

O efeito citotóxico dos tratamentos farmacológicos, em relação à viabilidade das células, foi investigado nas células ARPE-19 controles, incubadas com LPS (10 µg/mL), galectina-1 recombinante humana (hrGal-1: 0,04; 0,4 e 4 µg/mL) e o glicocorticoide dexametasona (Dex: 1µM), nos tempos experimentais de 2, 8, 24 e 48 horas. Os resultados mostraram que os diferentes tratamentos experimentais foram de baixa citotoxicidade e permitiram suas aplicações nos ensaios realizados com essas células (Figura 2).

4.3. Expressão endógena da proteína galectina-1 nas células ativadas pelo LPS e pós-tratadas com dexametasona

A fim de definir a localização e modulação da proteína anti-inflamatória Gal-1 nas células ARPE-19, nas condições controle, ativadas por LPS, tratadas ou não com Dex, utilizamos a técnica de imunocitoquímica ultraestrutural pós-inclusão, usando o anticorpo policlonal *rabbit* anti-Gal-1. A expressão da Gal-1 nas células dos grupos controle e ativadas por LPS, nos períodos de 2, 8, 24 e 48 horas, foi observada na membrana plasmática, citoplasma e núcleo (Figuras 3 a-e). Nesses compartimentos intracelulares, o grupo controle apresentou intensa imunorreatividade da Gal-1 em relação às células ativadas pelo LPS e tratadas ou não com Dex, nos diferentes tempos experimentais. Nenhuma imunomarcagem foi detectada nas secções utilizadas como controle da reação (Figura 3f).

As análises quantitativas das partículas de ouro associadas à Gal-1 mostrou que a expressão dessa proteína diminuiu após tratamento com LPS, particularmente nos tempos experimentais de 2 e 24 horas (Figura 3g). O tratamento com Dex aumentou significativamente a expressão endógena de Gal-1 após 24 horas da ativação com LPS em relação ao grupo não tratado.

4.4. Análise dos níveis de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células ARPE-19 submetidas à endotoxina e tratadas com hrGal-1 e dexametasona

As citocinas são moléculas multifuncionais que desempenham papéis importantes na defesa do hospedeiro nas reações inflamatórias de fase aguda. Com esse objetivo as citocinas IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IL-1 β e MCP-1 foram avaliadas nos sobrenadantes das células nas condições normais, ativadas pelo LPS, após 2, 8, 24 e 48 horas e tratadas com hrGal-1 nas concentrações de 0,04, 0,4 e 4 $\mu\text{g/mL}$ e Dex de 1 μM .

Nos períodos de 2, 8 e 24 horas, a administração de LPS aumentou a liberação de IL-6 e, somente em 24 horas a IL-8 (Figura 4) pelas células em relação aos controles. Enquanto, o efeito do tratamento com a hrGal-1, após ativação por LPS, na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$, inibiu a liberação da IL-6 e IL-8 em 8 (Figuras 4c e 4d) e 24 horas (Figuras 4e e 4f). Na concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$, o mesmo efeito foi observado em 24 horas (Figuras 4e e 4f). Curiosamente, no tempo inicial de 2 horas, nas três concentrações de hrGal-1 estudadas, não ocorreu efeito anti-inflamatório nas células, aumentando significativamente a liberação da citocina IL-6 (Figura 4a).

O tratamento com Dex também teve efeito inibitório na liberação das citocinas IL-6 e IL-8. No entanto, administração somente com Dex, nos mesmos tempos experimentais, não alterou a produção das citocinas em relação aos controles.

Em todas as condições experimentais analisadas, não ocorreu alterações significantes nos níveis de IL-6 e IL-8 após 48 horas (dados não mostrados). No entanto, a citocina MCP-1 somente apresentou aumento significativo após 48 horas da ativação das células ARPE-19 pelo LPS ($901 \pm 222 \text{ pg/mL}$) em relação ao grupo controle (118 ± 7 ; $P < 0,05$). Os níveis das citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β foram

detectados em baixos níveis (0.15 ± 1.5 pg/mL), sem diferenças significantes entre os grupos (dados não mostrados).

4.5. Papel do domínio reconhecedor de carboidrato (CRD) da Gal-1 na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8

Para avaliarmos se a atividade anti-inflamatória da Gal-1, nas células ARPE-19, estava associada ao seu CRD, repetimos os ensaios experimentais no período de 8 horas. Adicionamos no tratamento farmacológico com hrGal-1 (4 µg/mL) os açúcares com ou sem afinidade pelo CRD, respectivamente, β-galactose e sucrose (100 mM) (Figura 5).

A ativação das células ARPE-19 pelo LPS aumentou significativamente a liberação das citocinas IL-6 (Figura 5a) e IL-8 (Figura 5b), como observado anteriormente, enquanto esse efeito é inibido pelo tratamento com hrGal-1 e Dex. A adição dos açúcares β-galactose e sucrose não alterou a atividade anti-inflamatória da hrGal-1 na produção dessas citocinas, indicando que nas células ARPE-19 o mecanismo de ação da Gal-1 parece ser independente do CRD. Os tratamentos isolados nessas células com Dex, β-galactose e sucrose mostraram efeito semelhante ao grupo controle (Figuras 5a e 5b).

4.6. Expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) nas células ARPE-19

Os ensaios de imunofluorescência para a enzima COX-2, responsável pela formação de importantes mediadores biológicos denominados prostanoídes, foram conduzidos nas células controle, LPS, LPS/hrGal-1 e LPS/Dex, em 8 e 24 horas. Em relação às células controles (Figuras 6a e 7a), a ativação pelo LPS aumentou a imunorreatividade para COX-2 no citoplasma (Figuras 6b e 7b). O tratamento farmacológico com hrGal-1 (4 µg/mL) diminuiu a imunorreatividade da COX-2 no citoplasma dessas células nos períodos de 8 e 24 horas (Figuras 6c e 7c) quando comparamos com as células sem tratamento (Figuras 6b e 7b). Após o tratamento com Dex observamos expressão aumentada da enzima no citoplasma e núcleo, após 8 horas (Figura 6d), e menos intensa no em 24 horas (Figura 7d), em relação às células somente ativadas com LPS (Figuras 6b e 7b). Ausência de imunofluorescência nas células ARPE-19 após incubação com soro não imune (dados não mostrados).

As análises densitométricas confirmaram as observações morfológicas mostrando aumento significativo da expressão de COX-2 no citoplasma das células ativadas por LPS, após 8 e 24 horas (Figuras 6e e 7e). A administração da hrGal-1 diminuiu significativamente os níveis dessa enzima no citoplasma em relação às células não tratadas, nos dois tempos experimentais analisados. Efeito semelhante foi observado com Dex no núcleo e citoplasma dessas células, após 24 horas. No entanto, após 8 horas, esse glicocorticoide aumentou significativamente a expressão de COX-2 nos dois compartimentos celulares.

5. DISCUSSÃO

A inflamação é o principal fator contribuinte para o comprometimento funcional do epitélio pigmentado da retina (EPR) (LEUNG; BARNSTABLE; TOMBRAN-TINK, 2009), levando ao surgimento de inúmeras doenças oftalmológicas, uma vez que esse epitélio desempenha várias funções metabólicas e de apoio na retina sensorial (STEINBERG, 1985; STRAUSS, 2005; HAMILTON; LEACH, 2011). Nos tratamentos desses processos intraoculares são utilizados, em geral, os corticosteroides (AGRAWAL et al., 2010; CUNNINGHAM; WENDER, 2010; LEE; FOSTER, 2010). cujos efeitos adversos conduzem ao estudo de novas alternativas terapêuticas.

As propriedades anti-inflamatórias da galectina-1 (Gal-1) foram avaliadas em vários modelos de inflamação crônica e auto-imunidade, incluindo uveíte, encefalomielite autoimune, artrite, hepatite e diabetes (RABINOVICH et al., 1999b; SANTUCCI et al., 2000; TOSCANO et al., 2006; ILARREGUI et al., 2009). No entanto, são poucos os relatos da expressão dessa proteína em tecidos oculares ou em condições patológicas. Por essas razões, o presente estudo teve como objetivo definir o perfil da expressão da proteína Gal-1 e sua ação anti-inflamatória nas células ARPE-19 (linhagem do epitélio pigmentado da retina humana) normais e ativadas por lipopolissacarídeo (LPS). Essa foi a linhagem de escolha, exatamente pela relevância das características fenotípicas e funcionais dessas células humanas nos eventos inflamatórios e, também, pela possibilidade de comparar e confirmar os dados *in vivo* obtidos no nosso laboratório em tecidos oculares de roedores.

Inicialmente, verificamos pelo ensaio de viabilidade celular que as dosagens previamente determinadas de LPS, Gal-1 e dexametasona não apresentaram citotoxicidade para as células ARPE-19 por um período de 48 horas.

Considerando nosso interesse em estudar o efeito da Gal-1 nessa linhagem celular, investigamos sua expressão e localização endógena pela microscopia eletrônica de transmissão, cujos resultados mostraram imunorreatividade para a Gal-1 na membrana plasmática, citoplasma e núcleo das células. A ativação das células pelo LPS diminui os níveis endógenos da Gal-1 em todos os tempos experimentais em relação aos controles. Esses dados confirmam o papel da Gal-1 na fisiologia das células EPR controles e durante o processo inflamatório. Outras investigações também demonstraram a expressão da Gal-1 nas células EPR. Um desses estudos, por meio da técnica de imunofluorescência, confirmou que a Gal-1 é produzida pelo

EPR nas membranas de vitreorretinopatia proliferativa, e está presente na matriz extracelular, co-localizada com laminina e fibronectina (ALGE et al., 2006). Ensaios *in vitro*, usando as células ARPE, mostraram por meio de RT-PCR que a Gal-1 endógena é modulada positivamente durante o processo de diferenciação e proliferação celular, particularmente sob o efeito do fator de crescimento hepático (HGF) (ALGE et al., 2006). Ainda, a diminuição da expressão de Gal-1 nessas células, induzida por RNA de interferência, reduz sua migração em resposta ao HGF. Esses dados, em conjunto, confirmam o papel da Gal-1 na fisiologia das células EPR como fontes potenciais dessa lectina para os tecidos oculares durante o processo inflamatório.

Nossos estudos ultraestruturais mostraram, ainda, que após 24 horas do tratamento com Dex ocorreu aumento da expressão endógena de Gal-1 em relação às células somente ativadas por LPS e não tratadas, indicando um papel do glicocorticoide na regulação endógena dessa proteína. Investigações prévias em pólipos nasais (DELBROUCK et al., 2002; FERNANDES et al., 2010), incluindo resultado do nosso laboratório (SENA et al., 2006), também indicaram modulação positiva do RNAm e da proteína Gal-1 após tratamento com os glicocorticoides budesonida e betametasona, particularmente nos tecidos epitelial e conjuntivo. Essa modulação positiva está associada com a diminuição da transmigração de eosinófilos para os tecidos (DELBROUCK et al., 2002).

Nas investigações subsequentes, avaliamos o efeito do LPS nos sobrenadantes liberados pela célula ARPE-19, por meio da técnica de ELISA. O estímulo pelo LPS nessas células promoveu a liberação de mediadores envolvidos na resposta inflamatória, como as citocinas IL-6 e IL-8. Os resultados obtidos mostraram aumento significativo na liberação dessas citocinas, particularmente nos tempos experimentais de 8 e 24 horas pós-endotoxemia em relação ao controle. Esses dados corroboram outros estudos que mostraram liberação desses mediadores inflamatórios nas células EPR ativadas pelo LPS (PAIMELA et al., 2007; LEUNG; BARNSTABLE; TOMBRAN-TINK, 2009; MIMURA, 2012). A alta expressão de IL-6 e IL-8, também foram observadas no fluido lacrimal de pacientes com doenças do segmento anterior do olho como catarata e conjuntivite (FODOR et al., 2006). Essas citocinas tem sido relatadas como indutoras da degeneração celular e tecidual pois, camundongos *knockout* para IL-6, apresentam maior sobrevivência de células ganglionares da retina comparada aos animais selvagens após injúria do

nervo óptico (FISHER et al., 2001). Além disso, a IL-8 é tóxica para neurônios motores primários, efeito que pode ser revertido pela inibição do seu receptor IL-8RA (DE PAOLA et al., 2007).

Diferentemente do observado nos níveis das citocinas IL-6 e IL-8 nas células ARPE-19, os mediadores inflamatórios TNF- α , IL-10 e IL-1 β foram detectados em baixos níveis nas diferentes condições experimentais. Investigações utilizando essa mesma linhagem celular e estímulo pelo LPS durante 24 horas mostraram baixos níveis de detecção para IL-10 e IL-1 β (<5pg/mL) (LEUNG; BARNSTABLE; TOMBRAN-TINK, 2009). Enquanto, para o TNF- α os dados ainda são conflitantes, sendo positivos ou negativos após estímulo por LPS (LEUNG; BARNSTABLE; TOMBRAN-TINK, 2009, MIMURA, 2012).

A citocina MCP-1, embora detectada em níveis mais elevados nas células ARPE-19 após 48 horas de ativação pelo LPS, não apresentou diferenças significantes quando comparamos com os demais tempos estudados e as diferentes condições experimentais. Estudos envolvendo a ativação dessas células por TNF- α (WANG et al., 2012) e LPS (LEUNG, BARNSTABLE, TOMBRAN-TINK, 2009) demonstraram aumento na liberação de MCP-1 após 24 e 48 horas, indicando um papel importante das células EPR na regulação da resposta inflamatória.

A liberação das citocinas IL-6 e IL-8 também foi avaliada nas células ARPE-19 após endotoxemia, com ou sem tratamento da hrGal-1, nas concentrações de 0,04, 0,4 e 4 μ g/mL e dexametasona de 1 μ M. Os nossos resultados mostraram que o principal efeito anti-inflamatório da hrGal-1, inibindo a liberação da IL-6 e IL-8, nos períodos de 8 e 24 horas, ocorreu na concentração de 4 μ g/mL. Resultado semelhante foi obtido com dexametasona após ativação por LPS. Na concentração de 0,4 μ g/mL da hrGal-1, o mesmo efeito anti-inflamatório foi observado, mas somente em 24 horas. Diferentemente, o tratamento com a hrGal-1, nas três concentrações utilizadas, em 2 horas após endotoxemia, aumentou a liberação de IL-6 e IL-8 nas células ARPE-19. Esse efeito pró-inflamatório, aumentando a liberação de IL-6 e TNF- α após 48 horas da incubação com Gal-1, também foi obtido com monócitos humanos isolados e diferenciados sob o estímulo de IL-4 (LEVRONEY et al., 2005; FULCHER et al., 2006).

O entendimento dos mecanismos pelos quais a Gal-1 modula as respostas celulares nos processos inflamatórios ainda não está completamente determinado, especialmente nos modelos oculares. No entanto, a capacidade imunomoduladora

da Gal-1, na secreção de citocinas, tem sido evidenciada em modelos experimentais de doenças auto-imunes ou inflamatórias agudas, reduzindo os níveis de TNF- α , interferon- γ (IFN- γ), IL-1 β , IL-2 e IL-12 e, aumentando IL-5 e IL-10, conseqüentemente regulando a atividade dos leucócitos (RABINOVICH et al., 1999b; SANTUCCI et al., 2003; GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Ensaios *in vivo* mostraram que a pré-administração da Gal-1 inibe o extravasamento de células polimorfonucleares (PMNs) para a cavidade peritoneal depois de 4 horas da aplicação de carragenina em ratos (GIL et al., 2006a), IL-1 β (LA et al., 2003) e zymosan em camundongos (GIL; GULLO; OLIANI, 2010). Ainda, estudos revelaram que a Gal-1 exógena é capaz de interferir nas etapas específicas do rolamento e adesão firme dos neutrófilos no endotélio, diminuindo a transmigração celular para o tecido (COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008).

Em função da importância no entendimento da ação anti-inflamatória da Gal-1 e, com o objetivo de esclarecer se sua atividade nas células ARPE-19 estava associada ao seu CRD, avaliamos o efeito anti-inflamatório adicionando os açúcares β -galactose e sucrose nas culturas e analisando as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8, em 8 horas. A adição dos açúcares não alterou a atividade anti-inflamatória da Gal-1 sobre a produção dessas citocinas, sugerindo que nas células ARPE-19, o mecanismo de ação da Gal-1 é independente do CRD. Inversamente, estudo *in vitro* (ALGE-PRIGLINGER et al., 2009) mostrou que a Gal-1, além da atividade anti-inflamatória, inibe a adesão e migração das células do epitélio pigmentado da retina humana, efeito dependente do CRD. Um melhor entendimento desses mecanismos regulatórios nas células ARPE-19 ainda deverão ser analisados.

Finalmente, para complementar a investigação do efeito da Gal-1 na resposta inflamatória nas células, avaliamos a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), enzima fortemente ativada durante um estímulo inflamatório, desencadeando um importante papel na produção dos prostanoídes. Por meio da técnica de imunofluorescência, a expressão da COX-2 nessas células, após o processo de endotoxemia, aumentou no citoplasma após 8 e 24 horas em relação às células controles. Esse resultado da indução do LPS nas células ARPE-19 corrobora estudo prévio realizado em nosso laboratório (MIMURA, 2012). Outra investigação, também usando essas células (LUKIW et al., 2006), mostrou expressão positiva da COX-2 e resultados não significantes para COX-1 e COX-3, após 8 horas de ativação pelo IL-1 β e TNF- α .

Os nossos resultados mostraram ainda que nas células ARPE-19, ocorre após endotoxemia e tratamentos com a hrGal-1 diminuição da imunorreatividade para a COX-2 no citoplasma em 8 e 24 horas e, com dexametasona em 24 horas. Inversamente, estudo *in vitro* mostra altos níveis do RNAm de COX-2 e Gal-1 por RT-PCR e diminuição da expressão dessa enzima após silenciamento do gene da Gal-1 em linhagens de células de adenocarcinoma de pulmão (CHUNG et al., 2012). Esse silenciamento foi associado com diminuição dos níveis das quinases pelas vias de sinalização p38 MAPK, ERK1/2 e JNK. Ainda, esses pesquisadores mostraram que a adição de hrGal-1 (100 ng/mL) na cultura dessas células não altera os níveis de COX-2. Esses dados sugerem um papel da Gal-1 endógena, mas não da proteína exógena, na regulação da COX-2. Os resultados contraditórios, obtidos em relação aos tratamentos endógenos e exógenos com a Gal-1, podem ser explicados pelo uso de diferentes linhagens celulares e concentrações de hrGal-1.

Sumarizando os dados obtidos, nós mostramos que a proteína Gal-1 tem um efeito anti-inflamatório, não mediado por seu CRD, inibindo a liberação de IL-6 e IL-8 quando administrada nas células EPR humanas (ARPE-19) após ativação pelo inflamógeno bacteriano LPS. No tecido ocular, as células EPR representam uma fonte potencial de Gal-1 nos processos inflamatórios, podendo atuar na regulação da migração de leucócitos, particularmente neutrófilos (GIL et al., 2006a; GIL; GULLO; OLIANI, 2010) e eosinófilos (DELBROUCK et al., 2002).

Além do exposto, deve ser salientado que o EPR desempenha um papel imunológico na retina, podendo fagocitar patógenos (IRSCHICK et al., 2004) e secretar mediadores imunossupressores que podem diminuir a resposta inflamatória como PEDF, trombospondina e somatostatina (ZAMIRI et al., 2005; ZAMIRI et al., 2006; DETRICK; HOOKS, 2010). Dessa maneira, os dados obtidos nesse trabalho apontam a importância das células ARPE-19 como um alvo potencial de atividades imunológicas envolvendo a ação da proteína Gal-1, tendo em vista as aplicações dessa proteína como uma possível alternativa terapêutica nas doenças inflamatórias oculares.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as células do epitélio pigmentado da retina humana (linhagem ARPE-19), nas condições experimentais propostas, incluindo tratamento farmacológico com a proteína recombinante humana Galectina-1 (hrGal-1) permitem concluir:

1. Os tratamentos farmacológicos com o inflamógeno lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), LPS/hrGal-1, Dexametasona (Dex) e LPS/Dex, não são citotóxicos em relação às células controles.
2. Nas observações ultraestruturais, as células ARPE-19 apresentam alta expressão da Gal-1 endógena no grupo controle em relação aos submetidos à endotoxina após 2, 8, 24 horas e, aumenta significativamente no pós-tratamento em 24 horas.
3. Nos sobrenadantes das células, o inflamógeno LPS aumenta a liberação das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 após 2, 8 e 24 horas e IL-8 em 24 horas, e não apresentam diferenças significantes no período de 48 horas em todos os grupos experimentais propostos.
4. As citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β são detectadas nos sobrenadantes em baixos níveis (<5pg/mL) em todas as condições experimentais analisadas.
5. A citocina MCP-1, somente apresenta aumento significativo após 48 horas do estímulo inflamatório em relação às células controles.
6. A proteína recombinante humana Gal-1, na dosagem de 4 μ g/mL, possui efeito anti-inflamatório nas células ativadas por endotoxina.
7. Na cultura das células ARPE-19, a adição dos açúcares com ou sem afinidade pelo seu domínio reconhecedor de carboidrato (CRD), respectivamente β -galactose e sucrose, não altera a atividade anti-inflamatória da Gal-1 na liberação das citocinas IL-6 e IL-8.

8. O tratamento farmacológico com a hrGal-1, após 8 e 24 horas do estímulo inflamatório, atua seletivamente na diminuição da expressão do mediador COX-2 e, somente após 24 horas com Dex.

Associadas, essas conclusões mostram que a Gal-1 está envolvida na fisiologia do EPR nas condições normais e durante o estímulo inflamatório. Desse modo, os nossos resultados apontam essa proteína como um alvo promissor para terapias inovativas no tratamento de inflamações oculares.

7. FIGURAS

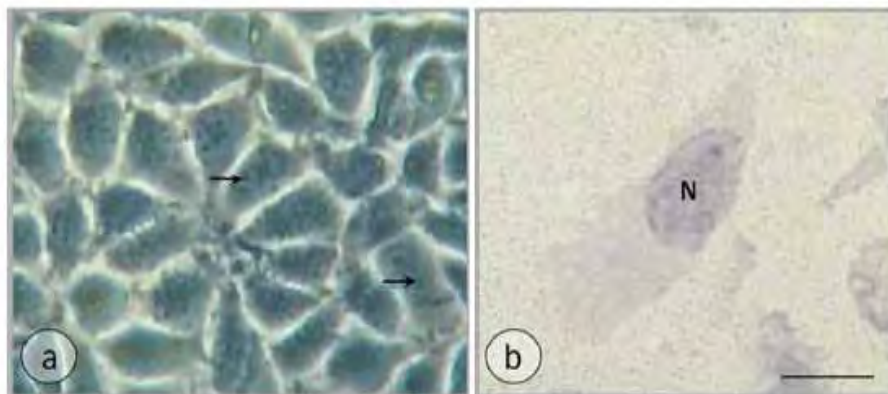


Figura 1. Análises morfológicas das células ARPE-19. [a] Células cultivadas em meio DMEM:F12 completo foram observadas no microscópio invertido de contraste de fase mostrando prolongamentos e grânulos citoplasmáticos (setas). [b] Na microscopia de luz essas células mostram núcleo (N) em geral deslocado para um dos polos, volumoso, eucromático e nucléolo evidente, caracterizando uma célula com alta atividade metabólica. Inclusão: *LR Gold*. Coloração: Azul de Toluidina. Barra: 10µm.

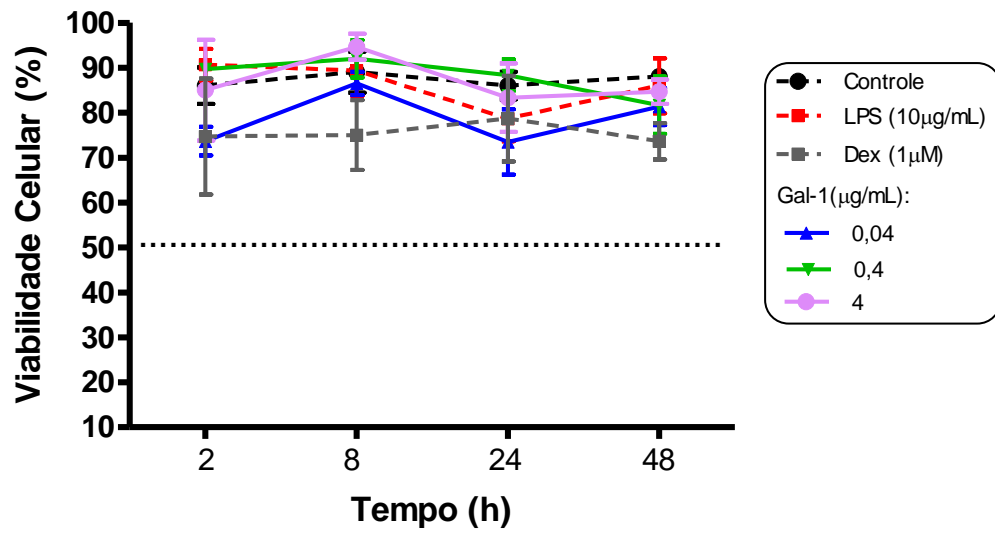


Figura 2. Efeitos dos tratamentos farmacológicos na viabilidade e proliferação das células ARPE-19. Curvas de viabilidade celular após tratamentos farmacológicos, nos períodos de 2, 8, 24 e 48 horas. Em todos os tempos experimentais, as amostras ativadas com LPS e tratadas com galectina-1 (hrGal-1) e dexametasona (Dex) apresentam viabilidade semelhante às células controles.

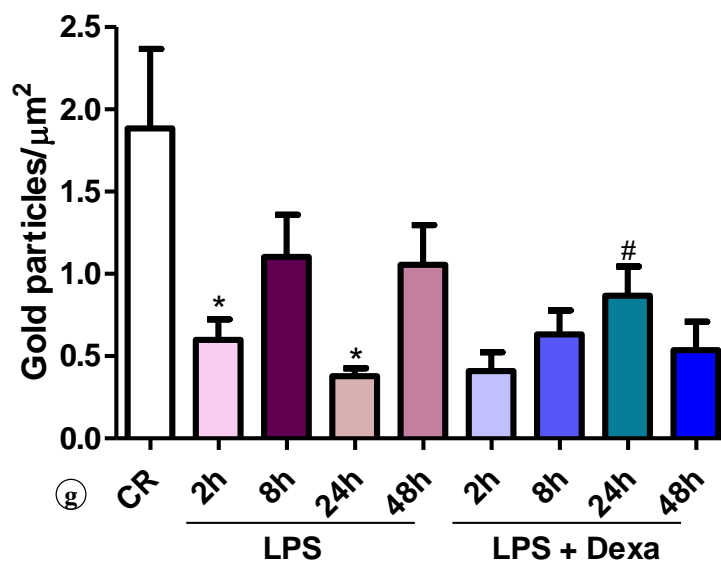
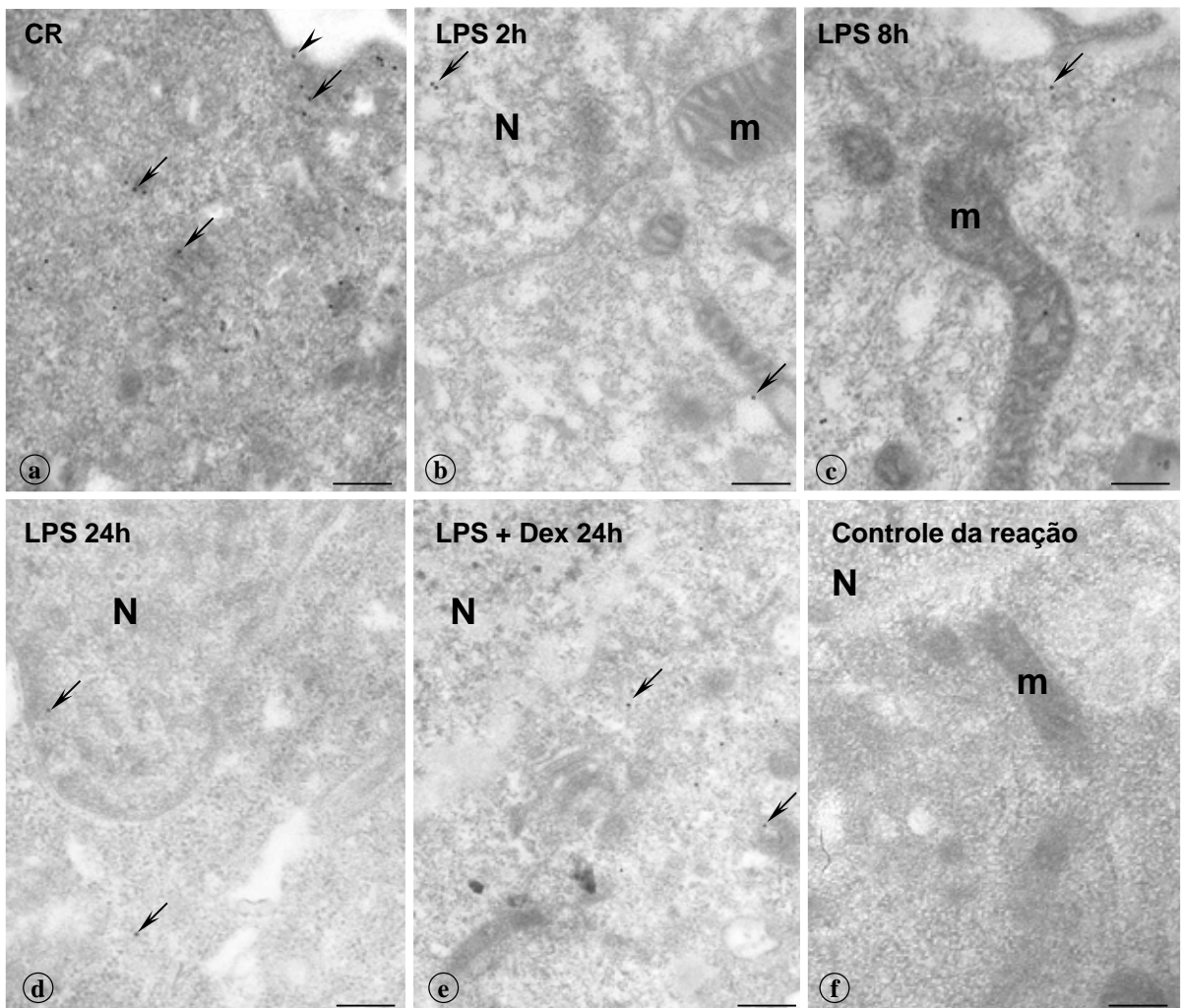
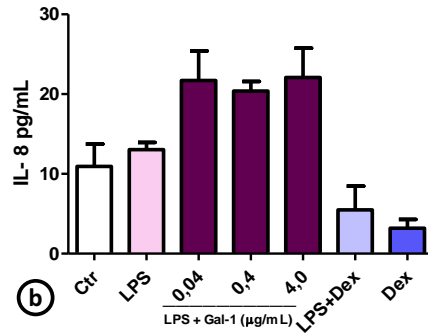
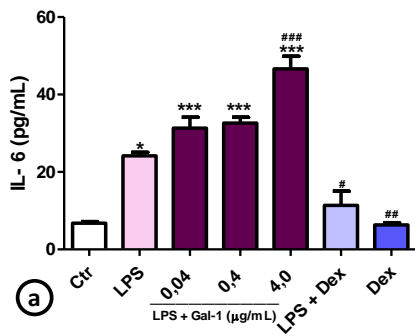
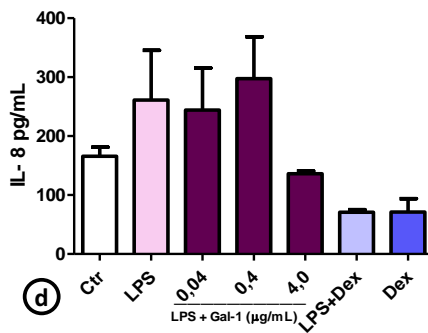
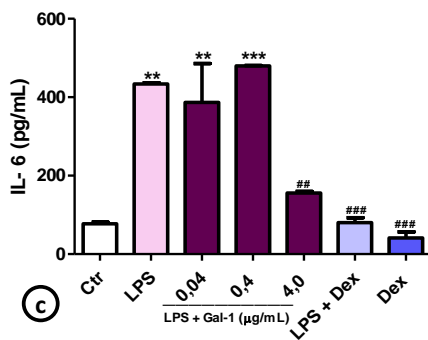


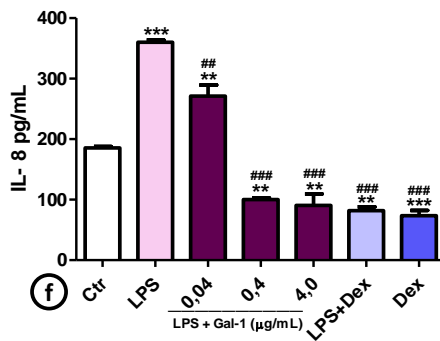
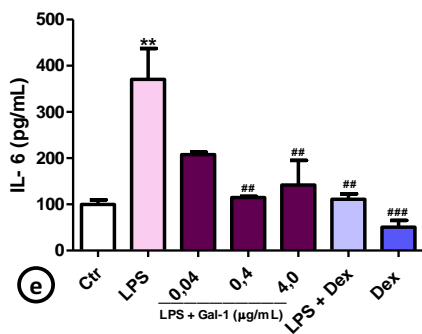
Figura 3. Detecção imunocitoquímica ultraestrutural da localização subcelular da proteína Gal-1 endógena nas células ARPE-19 ativadas pelo LPS e tratadas ou não com dexametasona. [a-e] Imunomarcação com partículas de ouro de 15nm (Gal-1) na membrana plasmática (cabeça de seta), citoplasma (setas) e núcleo (N) nas células controle (CR), ativadas por LPS (2, 8 e 24 horas) e tratadas com dexametasona após 24h. Grupo controle mostra intensa imunorreatividade da proteína [a] em comparação às células ativadas por LPS [b-e]. [f] Ausência de imunorreatividade para a Gal-1 em células utilizadas como controle da reação. Mitocôndria (m). Barra: 0,5µm. [g] Densidade das partículas de ouro coloidal associadas à proteína Gal-1. Os dados representam as médias ± SEM de 10 células analisadas por grupo. *P < 0.05, **P < 0.01 e ***P < 0.001 *versus* grupo controle e #P <0.05 *versus* LPS 24horas.



2 horas



8 horas



24 horas

Figura 4. Efeito dos tratamentos com a proteína Gal-1 recombinante humana (hrGal-1) nos sobrenadantes das células ARPE-19 submetidas à endotoxemia. Dosagem das citocinas IL-6 (a;c;e) e IL-8 (b;d;f). As células foram ativadas pelo LPS (10 µg/mL), tratadas com hrGal-1 (0,04; 0,4 e 4 µg/mL) ou dexametaxona (Dex: 1µM) e, os sobrenadantes, coletados após 2, 8, 24. Os valores foram demonstrados como média ± S.E.M.. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 *versus* controle, #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 *versus* LPS.

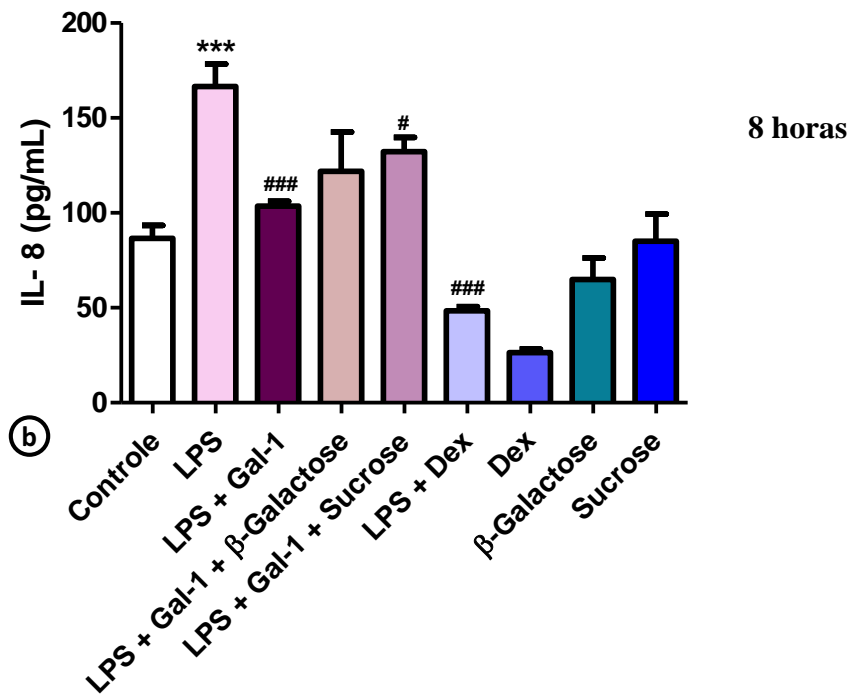
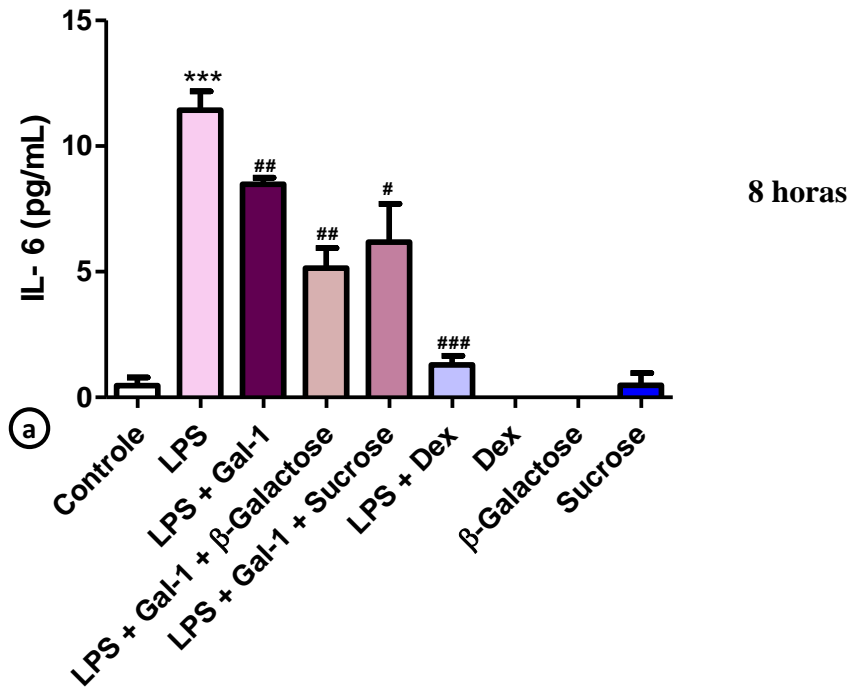


Figura 5. Papel do domínio reconhecedor de carboidrato (CRD) da Gal-1 na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 nos sobrenadantes das células ARPE-19. Dosagem das citocinas IL-6, IL-8 e adição dos açúcares com ou sem afinidade pelo CRD, respectivamente, β -galactose e sucrose. As células foram ativadas pelo LPS (10 μ g/mL), tratadas com hrGal-1 (4 μ g/mL) ou dexametasona (Dex: 1 μ M) e, os sobrenadantes, coletados após 8 horas. Os valores foram demonstrados como média \pm S.E.M.. ***P < 0,001 *versus* controle, #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 *versus* LPS.

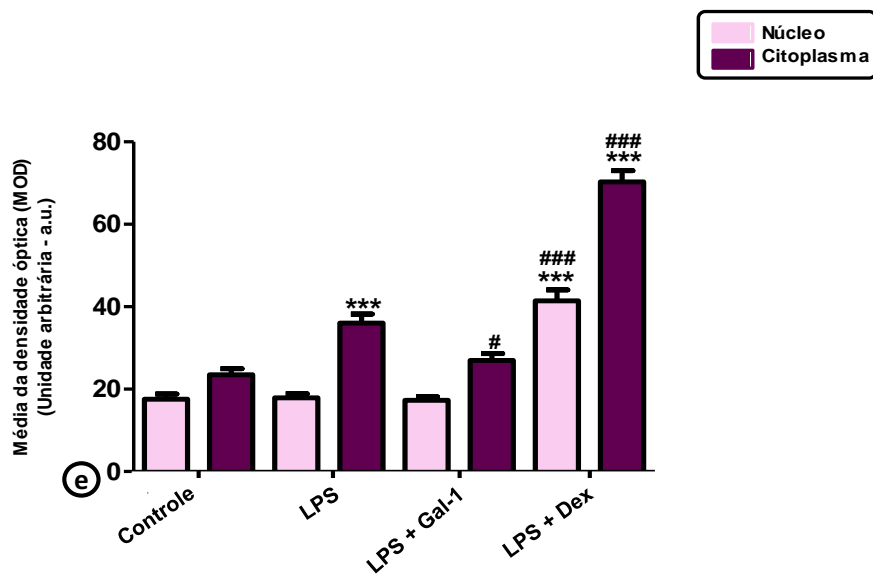
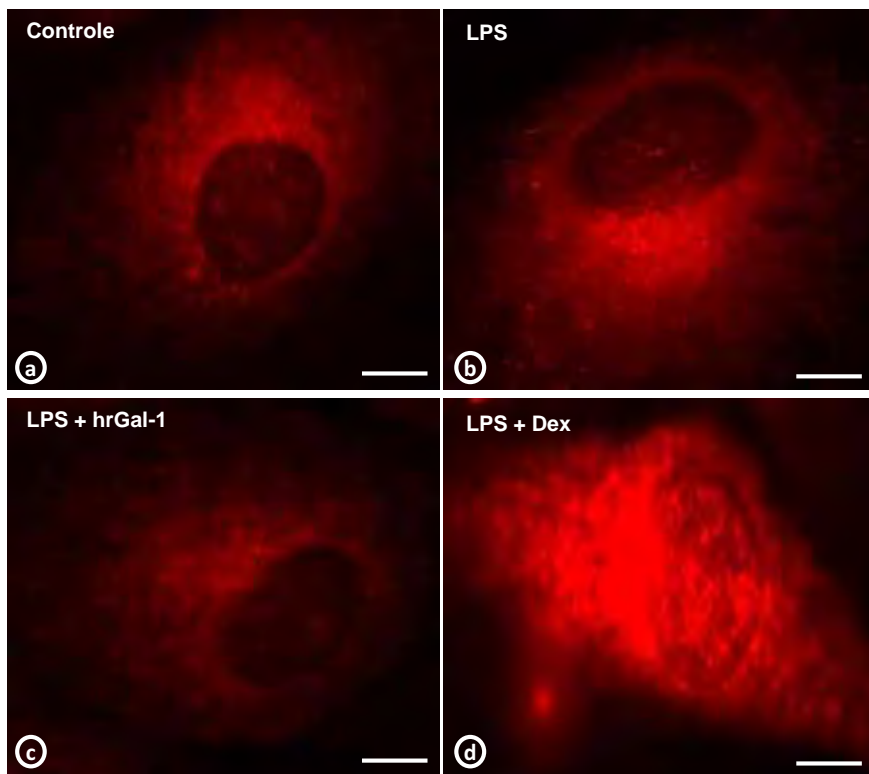


Figura 6. Análise da proteína Gal-1 sobre a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) nas células ARPE-19 previamente submetidas à endotoxemia por 8 horas por meio da imunofluorescência. [a] Célula controle. [b] Célula após endotoxemia, com positividade para COX-2, predominantemente citoplasmática. [c] Pós-tratamento com hrGal-1 (4 µg/mL) diminui imunorreatividade citoplasmática. [d] Célula ativada pelo LPS e tratada com Dex (1 µM) apresenta aumento da imunorreatividade no citoplasma e núcleo. Filtro: 546 nm de comprimento de onda. Barra: 10 µm. [e] Análises densitométricas da expressão da COX-2. Os resultados foram obtidos como média ± S.E.M. do índice densitométrico das células de três experimentos independentes. *P < 0,05, ***P < 0,001 *versus* controle; #P < 0,05, ###P < 0,001 *versus* LPS.

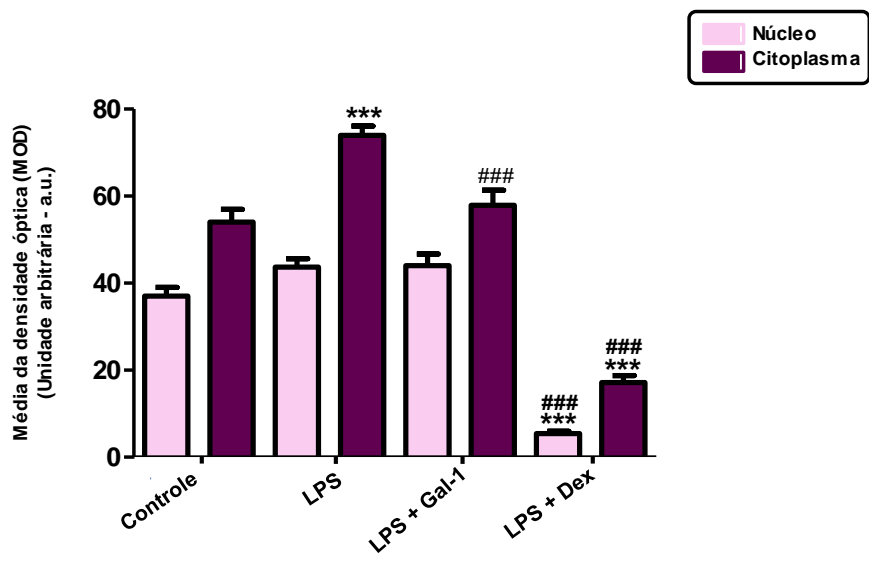
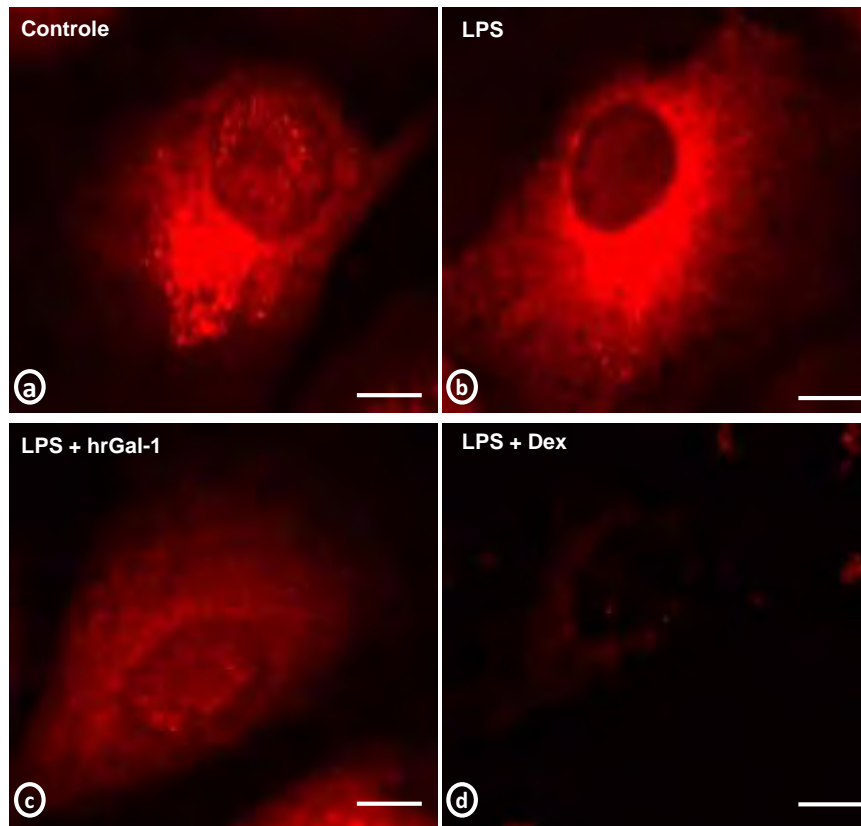


Figura 7. Análise da proteína Gal-1 sobre a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) nas células ARPE-19 previamente submetidas à endotoxemia por 24 horas por meio da imunofluorescência. [a] Célula controle. [b] Célula após endotoxemia, com positividade para COX-2 predominantemente citoplasmática. [c] Pós-tratamento com hrGal-1 (4 µg/mL) diminui imunorreatividade citoplasmática. [d] Célula ativada pelo LPS e tratada com Dex (1 µM) apresenta fraca imunorreatividade no citoplasma e núcleo. Filtro: 546 nm de comprimento de onda. Barra: 10 µm. [e] Análises densitométricas da expressão da COX-2. Os resultados foram obtidos como média ± S.E.M. do índice densitométrico das células de três experimentos independentes. ***P < 0,001 *versus* controle; ###P < 0,001 *versus* LPS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R. et al. Current approach in diagnosis and management of anterior uveitis. **Indian J Ophthalmol**, v. 58, n. 1, p. 11-9, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1998-3689. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20029142 >.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588> >.

ALGE, C. S. et al. Galectin-1 influences migration of retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 1, p. 415-26, Jan 2006. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16384992> >.

ALGE-PRIGLINGER, C. S. et al. Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by the human lectin galectin-1. **Mol Vis**, v. 15, p. 2162-73, 2009. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898636> >.

AZGHANI, A. O.; MILLER, E. J.; PETERSON, B. T. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. **Lung**, v. 178, n. 5, p. 261-9, 2000. ISSN 0341-2040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147311> >.

BANSAL, R.; GUPTA, V.; GUPTA, A. Current approach in the diagnosis and management of panuveitis. **Indian J Ophthalmol**, v. 58, n. 1, p. 45-54, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1998-3689. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029145> >.

BARONDES, S. H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J Biol Chem**, v. 269, n. 33, p. 20807-10, Aug 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8063692> >.

BLASER, C. et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 8, p. 2311-9, Aug 1998. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710209> >.

CAI, S.; BRANDT, C. R. Induction of interleukin-6 in human retinal epithelial cells by an attenuated Herpes simplex virus vector requires viral replication and NFkappaB activation. **Exp Eye Res**, v. 86, n. 2, p. 178-88, Feb 2008. ISSN 0014-4835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061164> >.

CELIK, I. et al. The prevalence of bacteraemia-related retinal lesions in seriously ill patients. **J Infect**, v. 52, n. 2, p. 97-104, Feb 2006. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15904970> >.

CHANG, S. W.; CHOU, S. F.; YU, S. Y. Dexamethasone reduces mitomycin C-related inflammatory cytokine expression without inducing further cell death in

corneal fibroblasts. **Wound Repair Regen**, v. 18, n. 1, p. 59-69, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1524-475X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002897> >.

CHIN, M. S. et al. Cyclooxygenase-2 gene expression and regulation in human retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 10, p. 2338-46, Sep 2001. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527948> >.

CHIU, Y. T. et al. Septic metastatic endophthalmitis complicating Klebsiella pneumoniae scalp furuncle. **Eye (Lond)**, v. 21, n. 1, p. 142-4, Jan 2007. ISSN 0950-222X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16858445> >.

CHUNG, L. Y. et al. Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 15, p. 4037-47, Aug 2012. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22696230> >

COOPER, D. et al. Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. **Methods Enzymol**, v. 480, p. 199-244, 2010. ISSN 1557-7988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816212> >.

COOPER, D.; NORLING, L. V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 6, p. 1459-66, Jun 2008. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372340> >.

_____. The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1253, p. 181-92, Apr 2012. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22256855> >.

CUNNINGHAM, E. J.; WENDER, J. Practical approach to the use of corticosteroids in patients with uveitis. **Can J Ophthalmol**, v. 45, n. 4, p. 352-8, Aug 2010. ISSN 0008-4182. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20648092 >.

DE PAOLA, M. et al. Chemokine MIP-2/CXCL2, acting on CXCR2, induces motor neuron death in primary cultures. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 6, p. 310-6, 2007. ISSN 1423-0216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391506> >.

DELBROUCK, C. et al. Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. **Lab Invest**, v. 82, n. 2, p. 147-58, Feb 2002. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850528> >.

DETRICK, B.; HOOKS, J. J. Immune regulation in the retina. **Immunol Res**, v. 47, n. 1-3, p. 153-61, Jul 2010. ISSN 1559-0755 (Electronic)

0257-277X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20082152 >.

DUNN, K. C. et al. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. **Exp Eye Res**, v. 62, n. 2, p. 155-69, Feb 1996. ISSN 0014-4835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698076> >.

DUNN, J. P. Review of immunosuppressive drug therapy in uveitis. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 15, n. 4, p. 293-8, Aug 2004. ISSN 1040-8738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232467> >.

DWYER, M. A. et al. Research resource: nuclear receptor atlas of human retinal pigment epithelial cells: potential relevance to age-related macular degeneration. **Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 360-72, Feb 2011. ISSN 1944-9917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239617> >.

EDELMAN, J. L. Differentiating intraocular glucocorticoids. **Ophthalmologica**, v. 224 Suppl 1, p. 25-30, 2010. ISSN 1423-0267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714178> >.

ELNER, S. G. et al. TLR4 mediates human retinal pigment epithelial endotoxin binding and cytokine expression. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 103, p. 126-35; discussion 135-7, 2005. ISSN 1545-6110. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057796> >.

FERNANDES, A. M. et al. Expression of genes that encode the annexin-1 and galectin-1 proteins in nasal polyposis and their modulation by glucocorticoid. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 76, n. 2, p. 213-8, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1808-8686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20549082> >.

FISHER, J. et al. Increased post-traumatic survival of neurons in IL-6-knockout mice on a background of EAE susceptibility. **J Neuroimmunol**, v. 119, n. 1, p. 1-9, Sep 2001. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525794> >.

FODOR, M. et al. Enhanced release of IL-6 and IL-8 into tears in various anterior segment eye diseases. **Ophthalmic Res**, v. 38, n. 4, p. 182-8, 2006. ISSN 0030-3747. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679805> >.

FORRESTER, J. et al. **The Eye: Basic Sciences in Practice**. 1999.

FULCHER, J. A. et al. Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 216-26, Jul 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785517> >.

GARCÍA-CABANES, C. et al. Inhibition of COX in ocular tissues: an in vitro model to identify selective COX-2 inhibitors. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 17, n. 1, p. 67-74,

Feb 2001. ISSN 1080-7683. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322639> >.

GIL, C. D. et al. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflamm Res**, v. 55, n. 3, p. 99-107, Mar 2006a. ISSN 1023-3830. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16673152> >.

GIL, C. D. et al. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 4, p. 338-44, Apr 2006b. ISSN 1065-6995. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530434> >.

GIL, C. D.; GULLO, C. E.; OLIANI, S. M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 1, p. 74-84, 2010. ISSN 1936-2625. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228929> >.

HAMILTON, R. D.; LEACH, L. Isolation and properties of an in vitro human outer blood-retinal barrier model. **Methods Mol Biol**, v. 686, p. 401-16, 2011. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21082384 >.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clin Exp Med**, v. 3, n. 2, p. 84-105, Sep 2003. ISSN 1591-8890. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14598184> >.

HEILIGENHAUS, A. et al. Anti-inflammatory treatment of uveitis with biologicals: new treatment options that reflect pathogenetic knowledge of the disease. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 248, n. 11, p. 1531-51, Nov 2010. ISSN 1435-702X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20737162> >.

HOKAMA, A.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 33, p. 5133-7, Sep 2008. ISSN 1007-9327. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777589> >.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, n. 4, p. 297-304, Aug 1993. ISSN 0959-6658. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8400545> >.

HOOKS, J. J. et al. IFN-beta provides immuno-protection in the retina by inhibiting ICAM-1 and CXCL9 in retinal pigment epithelial cells. **J Immunol**, v. 180, n. 6, p. 3789-96, Mar 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322185> >.

HOPKINS, P. A.; SRISKANDAN, S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. **Clin Exp Immunol**, v. 140, n. 3, p. 395-407, Jun 2005. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932500> >.

HUANG, W.; GLASS, C. K. Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 8, p. 1542-9, Aug 2010. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631355> >.

ILARREGUI, J. M. et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. **Nat Immunol**, v. 10, n. 9, p. 981-91, Sep 2009. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668220> >.

IRSCHICK, E. U. et al. Retinal pigment epithelial phagocytosis and metabolism differ from those of macrophages. **Ophthalmic Res**, v. 36, n. 4, p. 200-10, Jul-Aug 2004. ISSN 0030-3747 (Print) 0030-3747 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15292658 >.

JACKSON, T. L. et al. Endogenous bacterial endophthalmitis: a 17-year prospective series and review of 267 reported cases. **Surv Ophthalmol**, v. 48, n. 4, p. 403-23, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0039-6257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850229> >.

JANCEVSKI, M.; FOSTER, C. S. Cataracts and uveitis. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 21, n. 1, p. 10-4, Jan 2010. ISSN 1531-7021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19829114> >.

JANG, S. et al. Cytochemical alterations in the rat retina by LPS administration. **Neurochem Res**, v. 32, n. 1, p. 1-10, Jan 2007. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160463> >.

JOHN, S. K. et al. Loss of cone molecular markers in rhodopsin-mutant human retinas with retinitis pigmentosa. **Mol Vis**, v. 6, p. 204-15, Nov 2000. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063754> >.

KAESTEL, C. G. et al. The immune privilege of the eye: human retinal pigment epithelial cells selectively modulate T-cell activation in vitro. **Curr Eye Res**, v. 30, n. 5, p. 375-83, May 2005. ISSN 0271-3683. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020268> >.

KOEVARY, S. B. Ocular immune privilege: a review. **Clin Eye Vis Care**, v. 12, n. 3-4, p. 97-106, Dec 2000. ISSN 0953-4431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137423> >.

KOGA, T. et al. Induction of citrulline-nitric oxide (NO) cycle enzymes and NO production in immunostimulated rat RPE-J cells. **Exp Eye Res**, v. 76, n. 1, p. 15-21,

Jan 2003. ISSN 0014-4835. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589771> >.

LA, M. et al. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **Am J Pathol**, v. 163, n. 4, p. 1505-15, Oct 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507657> >.

LAMBIASE, A. et al. Toll-like receptors in ocular surface diseases: overview and new findings. **Clin Sci (Lond)**, v. 120, n. 10, p. 441-50, May 2011. ISSN 1470-8736. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21271987> >.

LE MERCIER, M. et al. Galectins and gliomas. **Brain Pathol**, v. 20, n. 1, p. 17-27, Jan 2010. ISSN 1750-3639. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371355> >.

LEE, F.; FOSTER, C. Pharmacotherapy of uveitis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 11, n. 7, p. 1135-46, May 2010. ISSN 1744-7666. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20367272 >.

LEE, E.; MACLAREN, R. E. Sources of retinal pigment epithelium (RPE) for replacement therapy. **Br J Ophthalmol**, v. 95, n. 4, p. 445-9, Apr 2011. ISSN 1468-2079. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601659> >.

LEFFLER, H. et al. Introduction to galectins. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p. 433-40, 2004. ISSN 0282-0080. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758066> >.

LEUNG, K. W.; BARNSTABLE, C. J.; TOMBRAN-TINK, J. Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling. **Mol Immunol**, v. 46, n. 7, p. 1374-86, Apr 2009. ISSN 1872-9142. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19157552> >.

LEVRONEY, E. L. et al. Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 413-20, Jul 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972675> >.

LIPINSKI, D. M.; THAKE, M.; MACLAREN, R. E. Clinical applications of retinal gene therapy. **Prog Retin Eye Res**, v. 32, p. 22-47, Jan 2013. ISSN 1873-1635. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995954> >.

LIU, F. T. Regulatory roles of galectins in the immune response. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 136, n. 4, p. 385-400, Apr 2005. ISSN 1018-2438. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775687> >.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1183, p. 158-82, Jan 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146714> >.

LIVERSIDGE, J. et al. Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retina barrier by autocrine PGE2 and membrane-bound mechanisms. **Cell Immunol**, v. 149, n. 2, p. 315-30, Jul 1993. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330312> >.

LUKIW, W. J. et al. A2E selectively induces cox-2 in ARPE-19 and human neural cells. **Curr Eye Res**, v. 31, n. 3, p. 259-63, Mar 2006. ISSN 0271-3683. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531283> >.

MIMURA, K. K. **Efeito da proteína anti-inflamatória anexina A1 nas células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação pelo inflamógeno lipopolissacarídeo**. 2012. 148 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal Paulista (UNIFESP/EPM), São Paulo.

MOCHIZUKI, M.; SUGITA, S.; KAMOI, K. Immunological homeostasis of the eye. **Prog Retin Eye Res**, Oct 2012. ISSN 1873-1635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23108335> >.

MUSTAFI, D.; ENGEL, A. H.; PALCZEWSKI, K. Structure of cone photoreceptors. **Prog Retin Eye Res**, v. 28, n. 4, p. 289-302, Jul 2009. ISSN 1873-1635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501669> >.

OLIANI, S. M. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol**, v. 158, n. 2, p. 603-15, Feb 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159197> >.

PAIMELA, T. et al. The effect of 17beta-estradiol on IL-6 secretion and NF-kappaB DNA-binding activity in human retinal pigment epithelial cells. **Immunol Lett**, v. 110, n. 2, p. 139-44, Jun 15 2007. ISSN 0165-2478 (Print) 0165-2478 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17532054 >.

QIN, S.; NI, M.; DE VRIES, G. W. Implication of S-adenosylhomocysteine hydrolase in inhibition of TNF-alpha- and IL-1beta-induced expression of inflammatory mediators by AICAR in RPE cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 49, n. 3, p. 1274-81, Mar 2008. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326758> >.

RABINOVICH, G. A. et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. **J Immunol**, v. 160, n. 10, p. 4831-40, May 1998. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590230> >.

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

Aug 1999a. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430627> >.

RABINOVICH, G. A. et al. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. **Immunology**, v. 97, n. 1, p. 100-6, May 1999b. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10447720> >.

RABINOVICH, G. A. et al. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 5, p. 1331-9, May 2000. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820379> >.

_____. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends Immunol**, v. 23, n. 6, p. 313-20, Jun 2002. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072371> >.

RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; FAINBOIM, L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 5, p. 741-52, May 2002. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994498> >.

_____. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p. 565-73, 2004. ISSN 0282-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758081> >.

RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 322-35, Mar 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22444630> >.

RAJPAL, R. K. et al. Intraocular pressure elevations with loteprednol etabonate: a retrospective chart review. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 27, n. 3, p. 305-8, Jun 2011. ISSN 1557-7732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21574815> >.

ROBMAN, L. et al. Exposure to Chlamydia pneumoniae infection and progression of age-related macular degeneration. **Am J Epidemiol**, v. 161, n. 11, p. 1013-9, Jun 2005. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901621> >.

ROMERO, M. D. et al. Circulating anti-galectin-1 antibodies are associated with the severity of ocular disease in autoimmune and infectious uveitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 4, p. 1550-6, Apr 2006. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16565391> >.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia - Texto e Atlas: em correlação com a biologia celular e molecular**. 4ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2007.

ROSENBAUM, J. T. Future for biological therapy for uveitis. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 21, n. 6, p. 473-7, Nov 2010. ISSN 1531-7021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829688> >.

SANTUCCI, L. et al. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, v. 31, n. 2, p. 399-406, Feb 2000. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655263> >.

_____. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1381-94, May 2003. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730878> >.

SENA, A. A. et al. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clin Exp Allergy**, v. 36, n. 10, p. 1260-7, Oct 2006. ISSN 0954-7894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17014434> >.

SHEN, D. F. et al. Biphasic ocular inflammatory response to endotoxin-induced uveitis in the mouse. **Arch Ophthalmol**, v. 118, n. 4, p. 521-7, Apr 2000. ISSN 0003-9950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766138> >.

SRIVASTAVA, A.; RAJAPPA, M.; KAUR, J. Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 17-18, p. 1165-71, Sep 2010. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416287> >.

STEINBERG, R. H. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. **Doc Ophthalmol**, v. 60, n. 4, p. 327-46, Oct 15 1985. ISSN 0012-4486 (Print) 0012-4486 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3905312 >.

STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiol Rev**, v. 85, n. 3, p. 845-81, Jul 2005. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15987797 >.

STRAUSS, O. Webvision - The Organization of the Retina and Visual System. 2011. Disponível em: < <http://webvision.med.utah.edu/sretina.html> >. Acesso em: 12/12/2012.

STREILEIN, J. W. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 11, p. 879-89, Nov 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668804> >.

TANG, P. H. et al. New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina. **Prog Retin Eye Res**, v. 32, p. 48-63, Jan 2013. ISSN 1873-1635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23063666> >.

TAYLOR, A. W.; YEE, D. G. Somatostatin is an immunosuppressive factor in aqueous humor. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 6, p. 2644-9, Jun 2003. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766068> >.

TEDESCO, R. C. et al. Ocular toxoplasmosis: the role of retinal pigment epithelium migration in infection. **Parasitol Res**, v. 92, n. 6, p. 467-72, Apr 2004. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14986110> >.

TOSCANO, M. A. et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **J Immunol**, v. 176, n. 10, p. 6323-32, May 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670344> >.

UEHARA, F.; OHBA, N.; OZAWA, M. Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 10, p. 2164-72, Sep 2001. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527926> >.

UNO, K. et al. Impaired expression of thrombospondin-1 in eyes with age related macular degeneration. **Br J Ophthalmol**, v. 90, n. 1, p. 48-54, Jan 2006. ISSN 0007-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16361667> >.

WANG, A. L. et al. Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. **Neurochem Int**, v. 47, n. 1-2, p. 152-8, Jul 2005. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15904993> >.

YANG, L. P.; ZHU, X. A.; TSO, M. O. A possible mechanism of microglia-photoreceptor crosstalk. **Mol Vis**, v. 13, p. 2048-57, 2007. ISSN 1090-0535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079678> >.

YEUNG, C. K. et al. The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 12, p. 5293-300, Dec 2003. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638729> >.

ZAMIRI, P. et al. Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, n. 3, p. 908-19, Mar 2005. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728547> >.

_____. Pigment epithelial growth factor suppresses inflammation by modulating macrophage activation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 9, p. 3912-8, Sep 2006. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936104> >.

ZARBIN, M. A. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Arch Ophthalmol**, v. 122, n. 4, p. 598-614, Apr 2004. ISSN 0003-9950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078679> >.

ZUÑIGA, E. et al. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 1, p. 73-9, Jul 2001. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435488> >.

9. ANEXO



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



PARECER CONSUBSTANCIADO PROJETO DE PESQUISA

IDENTIFICAÇÃO

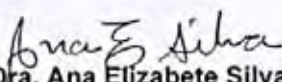
Nome do pesquisador: Nathália Martins Sonehara
Departamento: Biologia
Instituição: UNESP/IBILCE
Protocolo: 0013.0.229.000-11
Projeto: Análises da proteína anti-inflamatória galectina-1 nas células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação por endotoxina.

PARECER nº. 041/11

O presente parecer se refere à solicitação de avaliação do projeto de pesquisa intitulado "Análises da proteína anti-inflamatória galectina-1 nas células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação por endotoxina". Os pesquisadores estudarão a expressão e localização de um mediador anti-inflamatório (galectina-1) em células cultivadas de linhagem ARPE-19 (derivadas do epitélio pigmentado da retina humana normal), sem e com ativação por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), buscando entender melhor seu papel em tecido ocular normal e inflamado. As células serão divididas em 3 grupos: controle, ativadas por LPS e ativadas por LPS/tratadas com galectina-1 recombinante humana. Além disso, os pesquisadores realizarão dosagens de citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-6, IL-8 e MCP-1 nos sobrenadantes das células com LPS, tratadas ou não com a galectina-1. As investigações serão realizadas nos tempos 1, 2, 4, 24 e 48 horas. Os pesquisadores responsáveis têm experiência no campo a ser estudado e o projeto é relevante, dado que a busca por novas alternativas terapêuticas para casos de inflamação ocular podem ser benéficas, já que o tratamento atual (corticoides) responde por efeitos adversos indesejados. Os objetivos estão claramente descritos, bem como a metodologia, bibliografia, planilha de custos, auxílios financeiros e cronograma da pesquisa. Por tratar-se de um estudo com cultura de células de linhagem secundária, não envolvendo seres humanos, não há necessidade de acompanhamento por este CEP.

- () APROVADO
() COM PENDÊNCIA, máximo de 60 dias para atendimento
(X) RETIRADO
() NÃO APROVADO
() APROVADO, aguardar apreciação final da CONEP

São José do Rio Preto, 15 de junho de 2011.


Prof. Dra. Ana Elizabeth Silva
Coordenadora do CEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0013.0.229.000-11	
Projeto de Pesquisa Análises da proteína anti-inflamatória galectina-1 nas células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) após ativação por endotoxina			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 33997609810	Pesquisador Responsável Nathália Martins Sonehara	<i>Nathalia Martins Sonehara</i> Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 18/05/2011	Recebimento:	<i>[Assinatura]</i> Assinatura	

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ___/___/___

Assinatura