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

Mab Pereira Corrêa

Papel das Galectinas-1, -3 e -9 em doenças inflamatórias crônicas da pele

São José do Rio Preto
2021

Mab Pereira Corrêa

Papel das Galectinas-1, -3 e -9 em doenças inflamatórias crônicas da pele

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES/ FAPESP (2017/26872-5 – Auxílio Pesquisa)

Orientadora: Profª. Drª. Cristiane Damas Gil

Coorientadora: Profª. Drª Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto
2021

C824p

Corrêa, Mab Pereira

O papel das galectinas-1, -3 e -9 em doenças inflamatórias crônicas da pele / Mab Pereira Corrêa. -- São José do Rio Preto, 2021

99 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Cristiane Damas Gil

Coorientadora: Sonia Maria Oliani

1. Dermatite Atópica. 2. Psoríase. 3. Queratinócitos. 4. Transcriptoma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Mab Pereira Corrêa

Papel das Galectinas-1, -3 e -9 em doenças inflamatórias crônicas da pele

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES/ FAPESP (2017/26872-5 – Auxílio Pesquisa)

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Cristiane Damas Gil
UNIFESP – São Paulo, SP
Orientadora

Profª. Drª. Samira Yarak
UNIFESP – São Paulo, SP

Profª. Drª. Ana Paula Girol
UNIFIPA – Catanduva, SP

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto, SP

Profª. Drª. Thais Santana Gastardelo Bizotto
FAMERP – São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
01 de setembro de 2021

À minha querida avó, Silvia Camilo Corrêa, por ser meu exemplo de superação, uma mulher à frente de seu tempo que me inspira a não desistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela energia e não permitir esmorecer diante das adversidades. À Nossa Senhora Aparecida pelas bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Rosangela e Carlos Augusto, aos meus avós, Ruy e Silvia e minha irmãzinha Yasmin. Por serem minha base, ensinando e formando meu caráter.

À minha família que muito amo, especialmente aos meus tios Silvio, Fernando e Cesar e às minhas tias-avós Maria Irene e Valdeci. Obrigada pelos momentos maravilhosos, pelo apoio e crédito às minhas conquistas e por, acima de tudo, estarmos sempre unidos.

Ao Fabiano Brandini Molas e aos seus pais, Antônia e Denerval, por todo o apoio, compreensão e fé na minha capacidade.

À minha orientadora, Professora Dra. Cristiane Damas Gil, a quem tenho imensa admiração. Sempre agradeço pela oportunidade, por todas as orientações e me mostrar como é ser uma pessoa decidida, ética e corajosa.

À minha coorientadora, Professora Dra. Sonia Maria Oliani, pela oportunidade de aprendizado e experiência.

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

Aos professores e colegas do IBILCE/UNESP, pelas disciplinas e conhecimento.

Aos professores membros da banca de defesa, pela disponibilidade e auxílio em tornar esse trabalho melhor.

A todos os profissionais da seção de Pós-Graduação e entre outros setores da UNESP. Agradeço pelo empenho e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE/UNESP, Juliana Gusson, Julliene Guaraldi, Mayk dos Santos, Rafaela Molás, Thais Bravo e, em especial a Janesly Prates, por compartilharem seus conhecimentos, risadas e cafés da tarde.

À Dra. Jusciéle Moreli, por me ensinar a questionar minhas descobertas e a ser uma melhor pesquisadora.

À Dra Solange Corrêa Garcia Pires D'Ávila e ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) pelo auxílio, disposição e colaboração com este trabalho.

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

A todos os colegas do Laboratório de Histologia da UNIFESP, especialmente à Gisela Sasso, Izabella Lice, Joyce Covre, Leticia Sena e Vivian de Carvalho. Também agradeço à técnica Katia de Vasconcelos, Paulo Franco e Patrícia dos Reis, equipe que muito estimo e é exemplo de alegria e entusiasmo. Em especial, agradeço à Rebeca Correia por toda ajuda, conversas, puxões de orelha e amizade.

À minha orientadora do doutorado sanduíche, Dra. Karin Greco, por ser uma pessoa admirável. Agradeço imensamente por ter me orientado, por ser alguém de grande estima e inspiração.

Ao Griffin Institute e a University College London, no Reino Unido, por permitir do uso de seus laboratórios e dependências, onde pude aprender mais e desenvolver outras habilidades.

Aos colegas que tive oportunidade de conhecer durante o doutorado sanduíche, especialmente à Ferdinand Lali, Kajal Sachdev, Prasad Sawadkar e Priya Matharu, por me receberem no dia a dia de trabalho. Em especial, quero agradecer a Marina de Paula, amiga com a qual compartilhei trabalho, aprendi e ri muito. Obrigada por "segurar o meu poodle".

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Também agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche através do programa CAPES/PrInt.

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estudo de São Paulo (FAPESP 2017/26872-5 – Auxílio Pesquisa), pelo apoio financeiro aos projetos desenvolvidos no grupo de pesquisa.

A tantos outros amigos que de alguma maneira colaboraram com o desenvolvimento e elaboração desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos aqueles que me fizeram entender como eu quero ser, por serem difíceis ou por terem minha admiração. Isso me motiva a buscar as qualidades que aprecio, ter paciência e doar o conhecimento que adquiri.



FONTE: Arquivo pessoal da autora

Mãe: Silvia Camilo Corrêa

Minha mãe, nossa mãe

Podia ser Maria, mas...
Batizada Selva, gosto do padre no altar,
Foi ser a nove de dez
Da infância na roça à juventude em São Paulo
Uma trajetória impar
Trabalhou na capital e viveu a revolução nos costumes
Augusta a 120 por hora
Fã de Elvis
O primeiro salário virou livro
Muitos anos mais tarde, na aposentadoria,
O primeiro benefício também viraria livro
Voltou para sua cidade na barranca do Grande
Encontrou aquele rapaz que cultivava um visual
James Dean, ou seria o Sinatra dos primeiros anos?
Casou, foi ser do lar, contudo,
Uma cabeça moderna, educação sem castigos
Atenção e cuidados redobrados com a prole
Precisou de ajuda do terceiro para o quarto filho
Uma doméstica ou duas passaram desfazendo conceitos
Mas insistiram nos métodos mais modernos de educar
Incentivou as artes, leu para eles
Contos de fadas, folclore brasileiro,
As Histórias da Bíblia, História do Mundo para Crianças
Educou-os para o mundo, vasto mundo
Cuidou, cuidou, cuidou e cuidou
Vestiu de babados e bonés de Huguinho, Zezinho e Luizinho
Levou à escola, não insistiu em religião, os fez pensadores
Também cuidou de si, fez cursos
Culinária, saúde, pintura, tricô, crochê...
Surpreendida por dificuldades financeiras, permaneceu
Surpreendida pelo mal de chagas, permaneceu firme
Surpreendida pelo primeiro neto, permaneceu avó
Surpreendida pela terceira neta, permaneceu mãe
“Mãe, mamãe, mamãe, o avental todo sujo de ovo...”
Que avental?
Nos últimos tempos deixou os afazeres da cozinha
E prossegue sendo fiel ao modo anos 60 de ver a vida
Permanece Silvia!

Cesar Corrêa (2021, p. 31)

“[...] São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam. Elas nos ensinam a pensar. Se você dá uma resposta a um homem, tudo o que ele ganha é um fato qualquer. Mas, se você lhe der uma pergunta, ele procurará suas próprias respostas. [...] Assim, quando ele encontrar as respostas – continuei -, elas lhe serão preciosas. Quanto mais difícil a pergunta, com mais empenho procuramos a resposta. Quanto mais a procuramos, mais aprendemos.”

Patrick Rothfuss (2011, p 545)

RESUMO

As respostas imunes que envolvem as inflamações crônicas da pele, tais como psoríase e dermatite, são complexas e evidenciam o desafio no diagnóstico clínico, sendo fundamental o estudo de biomarcadores para melhor definição dessas doenças o que contribuirá para uma terapia personalizada. Nesse contexto, destacamos as galectinas (Gal), proteínas caracterizadas por uma sequência conservada de 135 aminoácidos no domínio reconhecedor de carboidrato (CRD) responsável pela afinidade à ligação com açúcares β-galactosídeos. Nas inflamações da pele, o papel das galectinas-1, -3 e -9 tem sido mostrado nas dermatites e psoríase, podendo atuar com papel pró ou anti-inflamatório e, com isso, avaliamos o padrão de expressão das Gal-1, -3 e -9 e sua relação com as células inflamatórias na psoríase (Ps) e dermatite atópica (DA). Também, avaliamos *in vitro* o efeito da administração das galectinas recombinantes na produção de citocinas pelos queratinócitos, linhagem HaCaT, estimulados por TNF-α/IFN-γ ou IL-17 ou IL-4. Nos estudos, foram utilizadas biópsias de pele humana diagnosticadas para Ps ou DA (n = 10/9, respectivamente) e de camundongos Balb/c em modelo de DA induzida pela ovalbumina de galinha. Para o grupo controle, foram utilizadas biópsias de margens de pele clinicamente normais removidas junto com tumores de pele (n=10). A DA foi caracterizada por níveis aumentados de Gal-9 na pele de camundongo e humana, especialmente na epiderme, com influxo acentuado de eosinófilos e mastócitos positivos para Gal-9 em comparação com o grupo de controle. *In vitro*, a Gal-9 mostrou efeito imunomodulador nos queratinócitos, diminuindo a liberação de IL-6 em queratinócitos estimulados por IL-4 ou aumentando os níveis de IL-6 e RANTES quando estimuladas por IL-17 ou TNF-α/IFN-γ, respectivamente. Sob o estímulo com IL-17, o tratamento com Gal-9 também alterou a taxa de proliferação das células. Em relação às Gal-1 e Gal-3, diferentes padrões de expressão das proteínas e RNAm foram mostrados na epiderme de pacientes com DA e Ps. A Gal-3 apresentou intensa imunorreatividade na epiderme de pacientes com DA, e redução na intensidade em amostras de Ps, enquanto o padrão oposto foi detectado para Gal-1 (mais fortemente expresso na Ps). As peles com DA e Ps mostraram células inflamatórias imunopositivas para Gal-1 e Gal-3. *In vitro,* a adição de Gal-3 anulou a liberação de IL-6 e RANTES em queratinócitos estimulados por IL-4 e IL-17A, enquanto a Gal-1 reduziu a liberação de

IL-6, IL-8 e RANTES em células estimuladas por IL-17A. Sob condições de estimulação por IL-4, a Gal-1 reduziu as taxas de migração dos queratinócitos, e sob estimulação com IL-17A ambas as galectinas aumentaram a migração celular em comparação com células não tratadas. No geral, níveis aumentados de Gal-9 na pele com DA contribuem para o controle da resposta inflamatória e do processo proliferativo dos queratinócitos, sugerindo esta lectina como um alvo terapêutico relevante para a DA e sendo um biomarcador para sua severidade. Além disso, as Gal-1 e Gal-3 representam biomarcadores potenciais para diferenciar as biópsias de pele com Ps e DA e, seus efeitos imunorreguladores e de migração nos queratinócitos, as tornam ferramentas terapêuticas interessantes

Palavras–chave: Dermatite Atópica. Psoríase. Queratinócitos. Transcriptoma.

ABSTRACT

Immune responses that involve chronic skin inflammation, such as psoriasis and dermatitis, are complex and demonstrate the challenge in clinical diagnosis, and the study of biomarkers is essential to better define these pathologies, which will contribute to personalized therapy. In this context, we highlight galectins (Gal), proteins characterized by a conserved sequence of 135 amino acids in the carbohydrate recognizing domain (CRD) responsible for binding affinity with β-galactoside sugars. In skin inflammation, the role of Gal-1, -3, and -9 has been shown in dermatitis and psoriasis, and may act as a pro or anti-inflammatory role and, thus we evaluated the expression pattern of galectins-1, -3, and -9 and its relationship with inflammatory cells in psoriasis (Ps) and atopic dermatitis (AD). Also, evaluated *in vitro* the effect of administration of recombinant galectins on the production of cytokines by keratinocytes, HaCaT cell line, stimulated by TNF-α/IFN-γ or IL-17 or IL-4. In our studies, human skin biopsies diagnosed for Ps or AD (n = 10/9, respectively) and a Balb/c mouse in a chicken ovalbumin-induced AD model. For the control group, biopsies of clinically normal skin margins removed along with skin tumors (n=10) were used. AD was characterized by increased levels of Gal-9 in mouse and human skin, especially in the epidermis, and with a marked influx of Gal-9 positive eosinophils and mast cells compared to the control group. Our findings are different expression patterns for Gal-1 and Gal-3 proteins and mRNA in the epidermis of patients with AD and Ps. Gal-3 showed intense immunoreactivity in the epidermis of patients with AD, and reduced intensity in Ps samples, while the opposite pattern was detected for Gal-1 (more strongly expressed in Ps). Skins with AD and Ps showed immunopositivity for inflammatory cells to Gal-1 and Gal-3. *In vitro*, Gal-9 showed an immunomodulatory effect on keratinocytes, decreasing IL-6 release in IL-4-stimulated keratinocytes or increasing IL-6 and RANTES levels when stimulated by IL-17 or TNF-α/IFN-γ, respectively. Under IL-17 stimulation, Gal-9 treatment also altered the rate of cell proliferation. Regarding Gal-1 and Gal-3, different expression patterns of proteins and mRNA were shown in the epidermis of patients with AD and Ps. Gal-3 showed intense immunoreactivity in the epidermis of patients with AD, and reduced intensity in Ps samples, while the opposite pattern was detected for Gal-1 (strongly expressed in Ps). Skins with AD and Ps showed immunopositivity for inflammatory cells to Gal-1 and Gal-3. *In vitro,* Gal-3 addition canceled the release of IL-6 and RANTES in IL-4 and IL-

17A-stimulated keratinocytes, while Gal-1 reduced the release of IL-6, IL-8, and RANTES in IL17A-stimulated cells. Under IL-4 stimulation conditions, Gal-1 reduced keratinocyte migration rates, and under IL-17A stimulation both galectins increased cell migration compared to untreated cells. In general, increased levels of Gal-9 in AD skin contribute to control the inflammatory response and proliferative process of keratinocytes, suggesting this lectin is a relevant therapeutic target for AD and being a biomarker for its severity. In addition, Gal-1 and Gal-3 represent as potential biomarkers to differentiate Ps and AD skin biopsies, and their immunoregulatory and migrating effects on keratinocytes make them interesting therapeutic tools.

Keywords: Atopic Dermatitis. Psoriasis. Keratinocytes. Transcriptome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Camada espinhosa da epiderme. 22
Figura 2 – Estrutura da epiderme e suas células residentes 23
Figura 3 – Região papilar e reticular da derme humana 24
Figura 4 – Representação da estrutura da derme e suas células residentes 25
Figura 5 – Ativação do sistema imune na pele 30
Figura 6 – A patogênese da DA 34
Figura 7 – Características histológicas da DA e Ps 36
Figura 8 – Patogênese da Ps 38
Figura 9 – Estrutura das Galectinas 41

Capítulo 1 – Versão aceita do artigo: *The Role of Galectin-9 as Mediator of Atopic Dermatitis: Effect on Keratinocytes*
Figura 1.1 – *Experimental model of Atopic Dermatitis* 47
Figura 1.2 – *Inflammatory response in the skin* 50
Figura 1.3 – *Expression of Gal-9 in the mouse skin* 51
Figura 1.4 – *Expression of Gal-9 in the human skin* 52
Figura 1.5 – *Effect of Gal-9 on cytokine release by keratinocytes* 53
Figura 1.6 – *Effect of Gal-9 on HaCaT proliferation rate* 53
Figura 1.7 – *Scratch assay: assessment of HaCaT migration rate after cytokine stimulation and Gal-9 treatment* 54

Capítulo 2 – Manuscrito: *Galectin-1 and Galectin-3 in Atopic Dermatitis and Psoriasis: Potential Biomarkers and Immunoregulatory Roles*
Figura 2.1 – *Histopathological findings* 78
Figura 2.2 – *Gal-1 and Gal-3 protein expression in the skin* 79
Figura 2.3 – *Heatmaps based on the Z-scores of LGALS1 and LGALS3 transcriptional levels* 80
Figura 2.4 – *Immunomodulatory effect of Gal-1 and Gal-3 on human keratinocytes* 81
Figura 2.5 – *Scratch assay: assessment of HaCaT migration rate after cytokine stimulation and Gal-1 or Gal-3 treatments* 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	Anticorpo
ADSC-CM	Células tronco derivadas de adipócitos
AKT	Proteína quinase
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BalF	Fluido do lavado broncoalveolar
BSA	Albumina sérica bovina
CCL	Ligante de quimiocina CC
cDNA	DNA complementar
CRD	Domínio reconhecedor de carboidrato
CXCL	Ligante de quimiocina CXC
C/EBP	Ligante CCAAT/potenciador
DA	Dermatite Atópica
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DC	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECL	Quimiluminescência aprimorada (Substrato base-luminol)
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilos
EPO	Peroxidase de eosinófilos
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF	Fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos
HaCaT	Linhagem de queratinócitos humanos imortalizados
H&E	Hematoxilina-Eosina
FcεR	Receptor Fc para IgE
Gal	Galectina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IgE	Imunoglobulina E
i.p	intraperitoneal
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
K	Citoqueratina
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LC	Célula de Langerhans
MBP	Proteína básica principal
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
MTT	(3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-Brometo de Difeniltetrazólio)
NFκB	Fator nuclear kappa B
OVA	Ovalbumina de galinha
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PASI	Grau de severidade do processo psoriático
PBS	Tampão fosfato-salino
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
Ps	Psoríase
RNA	Ácido ribonucleico

SALT	Tecido linfoide associado a pele
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TBS	Tampão Tris-salino
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
TLR	Receptores do tipo *Toll*
TNF	Fator de necrose tumoral
TSLP	Linfopoietina estromal tímica
UV	Luz Ultravioleta
Vs	versus
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Micrograma
mg / mL	Miligrama por mililitro
µl	Microlitro
h	Horas
mg / kg	Miligrama por quilograma
µm	Micrometro
%	Porcentagem
ºC	Grau Celsius
g / L	Grama por litro
mM	Milimolar
mL	Mililitro
ng / mL	Nanograma por mililitro
pg / mL	Picograma por mililitro
OD	Densidade ótica

SUMÁRIO

PREFÁCIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 A Pele 20

1.1.1 Estrutura e morfologia 20

1.1.2 Imunologia da Pele 26

1.2 Dermatite Atópica 31

1.3 Psoríase 35

1.4 Dermatite Atópica x Psoríase 39

1.5 Galectinas 40

2 OBJETIVOS 44

2.1 Geral 44

2.2 Específicos 44

3 CAPÍTULO 1 – *Versão aceita do artigo: The role of galectin-9 as mediator of atopic dermatitis: effect on keratinocytes* 45

4 CAPÍTULO 2 – *Manuscrito: Galectin-1 and galectin-3 in atopic dermatitis and psoriasis: potential biomarkers and immunoregulatory roles* 61

5 CONCLUSÕES 83

REFERÊNCIAS 84

APÊNDICE A – *Galectin-3: role in ocular allergy and potential as a predictive biomarker* 91

APÊNDICE B – *Lack of endogenous Annexin A1 increases mast cell activation and exacerbates experimental atopic dermatitis* 92

APÊNDICE C – *Bellis perennis extract mitigates UVA-induced keratinocyte damage: photoprotective and immunomodulatory effects* 93

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA FAMERP 94

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA UNESP 98

PREFÁCIO

O desenvolvimento da tese de doutorado resultou em dois artigos intitulados "*The Role of Galectin-9 as Mediator of Atopic Dermatitis: Effect on Keratinocytes*" e "*Galectin-1 and Galectin-3 in Atopic Dermatitis and Psoriasis: Potential Biomarkers and Immunoregulatory Roles*". O primeiro artigo foi publicado na *Cells,* com fator de impacto 6,600, da editora MDPI, enquanto o segundo está em fase de análise por revista indexada internacional.

Desta maneira, a tese está apresentada com uma introdução contendo revisão da literatura sobre os aspectos morfológicos, fisiológicos e imunológicos da pele humana. Além disso, são apresentados tópicos sobre a dermatite atópica, psoríase e galectinas. Em sequência, apresentamos o objetivo geral e específicos do trabalho. As ilustrações da tese foram feitas pela própria autora através do *software CorelDRAW* 2020 e *Adobe Photoshop CS6.*

Os artigos estão incluídos em inglês seguindo as normas de formatação recomendada pelas revistas e, por último, as conclusões em português. Os demais artigos publicados como coautora durante o período de doutorado estão incluídos como apêndices.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Pele

A pele é um órgão complexo do corpo humano, com importantes funções para manutenção da fisiologia, tendo uma área de aproximadamente 2 m^2 em adultos e correspondendo a aproximadamente 16% do peso corporal (Slominski *et al.*, 2015; Junqueira, 2018). Atua na prevenção da perda de fluidos, regula a temperatura corporal, transmite estímulos sensoriais como dor, toque e calor. Também age na proteção contra os raios ultravioletas (UV) do sol, síntese de vitamina D, e nas respostas imunológicas e inflamatórias, tendo um sistema imunológico altamente especializado, crucial para o reparo e defesa (Slominski *et al.*, 2015; Tsakovska *et al.*, 2017; Nguyen e Soulika, 2019). Na histologia é composta por 2 camadas, a epiderme de origem embrionária ectodérmica e a derme com origem mesodérmica (Tsakovska *et al.*, 2017). Geralmente, é classificada em dois tipos: pele espessa (epiderme com mais de 5 mm de espessura, recobre a palma das mãos e planta dos pés) e pele delgada (Junqueira, 2018). Ainda, abriga anexos como folículos pilosos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas (Slominski *et al.*, 2015).

1.1.1 Estrutura e morfologia

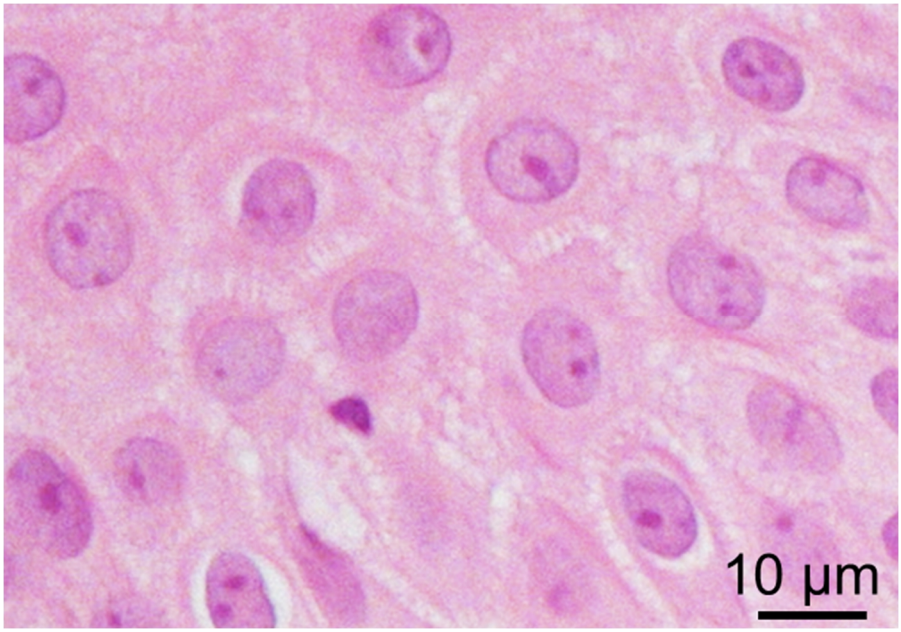
A epiderme é a parte mais superficial da pele, com células justapostas e epitélio estratificado que formam uma barreira composta majoritariamente por camadas de queratinócitos unidos que sofrem diferenciações, migrando da camada basal até a camada mais externa (Tsakovska *et al.*, 2017). Os queratinócitos são compostos por moléculas do citoesqueleto, como os filamentos intermediários (permitem a sua estrutura tridimensional), filamentos de actina (permitem a sua motilidade) e os microtúbulos (fazem parte do transporte intracelular). Os filamentos intermediários mais importantes da epiderme são as citoqueratinas (K) e cada uma delas possui uma expressão distinta no epitélio, sendo as K5/K14 tipicamente expressas na camada basal proliferativa, enquanto K1/K10 nas camadas de diferenciação suprabasais. Particularmente, as K16 e K17 são conhecidas por serem hiperproliferativas, sendo encontradas em doenças como a psoríase (Rivitti, 2018; Donetti *et al.*, 2020; Kim e Lim, 2021).

A camada mais profunda da epiderme é constituída por queratinócitos basais e melanócitos, sendo adjacente a *membrana basal*, que é uma fina camada de matriz extracelular (MEC) que sustenta a porção basal, e é composta majoritariamente de colágeno do tipo IV e outras moléculas como laminina, capaz de proporcionar local de adesão para os hemidesmossomos (Baroni *et al.*, 2012; Tsakovska *et al.*, 2017; Alberts, 2018). Os queratinócitos da camada basal têm formato mais cúbico e núcleo grande. Nessa camada há equilíbrio entre a divisão mitótica e a diferenciação celular, algumas células em divisão migram para a camada acima ou vão somar a população de células tronco*,* responsáveis pela renovação celular (Rivitti, 2018; Chieosilapatham *et al.*, 2021). A renovação é um evento que pode levar até 28 dias, dependendo da idade/local da pele (Baroni *et al.*, 2012). O balanço da renovação do epitélio é importante para a manutenção da homeostase e em doenças inflamatórias, como a psoríase e a dermatite atópica (Baroni *et al.*, 2012; Rivitti, 2018; Chieosilapatham *et al.*, 2021).

A porção acima da camada basal é chamada camada espinhosa, composta por células poligonais com núcleo de posição central, que vão se achatando em direção a superfície. Nesses queratinócitos, o citoplasma possui expansões com feixes de filamentos de queratina que se unem as outras células por meio dos *desmossomos*, conferindo a célula o aspecto espinhoso (Baroni *et al.*, 2012; Rivitti, 2018; Donetti *et al.*, 2020).

A camada espinhosa é seguida pela camada granulosa, formada por células achatadas com grande quantidade de grânulos de querato-hialina. Esses grânulos possuem uma proteína rica em cistina e histidina fosforilada, responsável pela basofilia apresentada (Junqueira, 2018). Outros componentes dos grânulos são a profilagrina (origina a filagrina) e loricrina. Uma vez formada a filagrina, há união com a queratina, formando microfilamentos (Chieosilapatham *et al.*, 2021). A sua mutação pode ser associada a doenças como a dermatite atópica. Nessa camada os grânulos lamelares, responsáveis pela produção de glicolipídios, são depositados na superfície das células, auxiliando na formação da barreira epitelial, agindo contra a desidratação e penetração de substâncias na pele (Losquadro, 2017; Junqueira, 2018). A figura 1 mostra um corte histológico de pele humana, corada com Hematoxilina-Eosina (H&E), evidenciando a camada espinhosa e suas junções com aspecto “espinhoso”.

Figura 1 – Camada espinhosa da epiderme

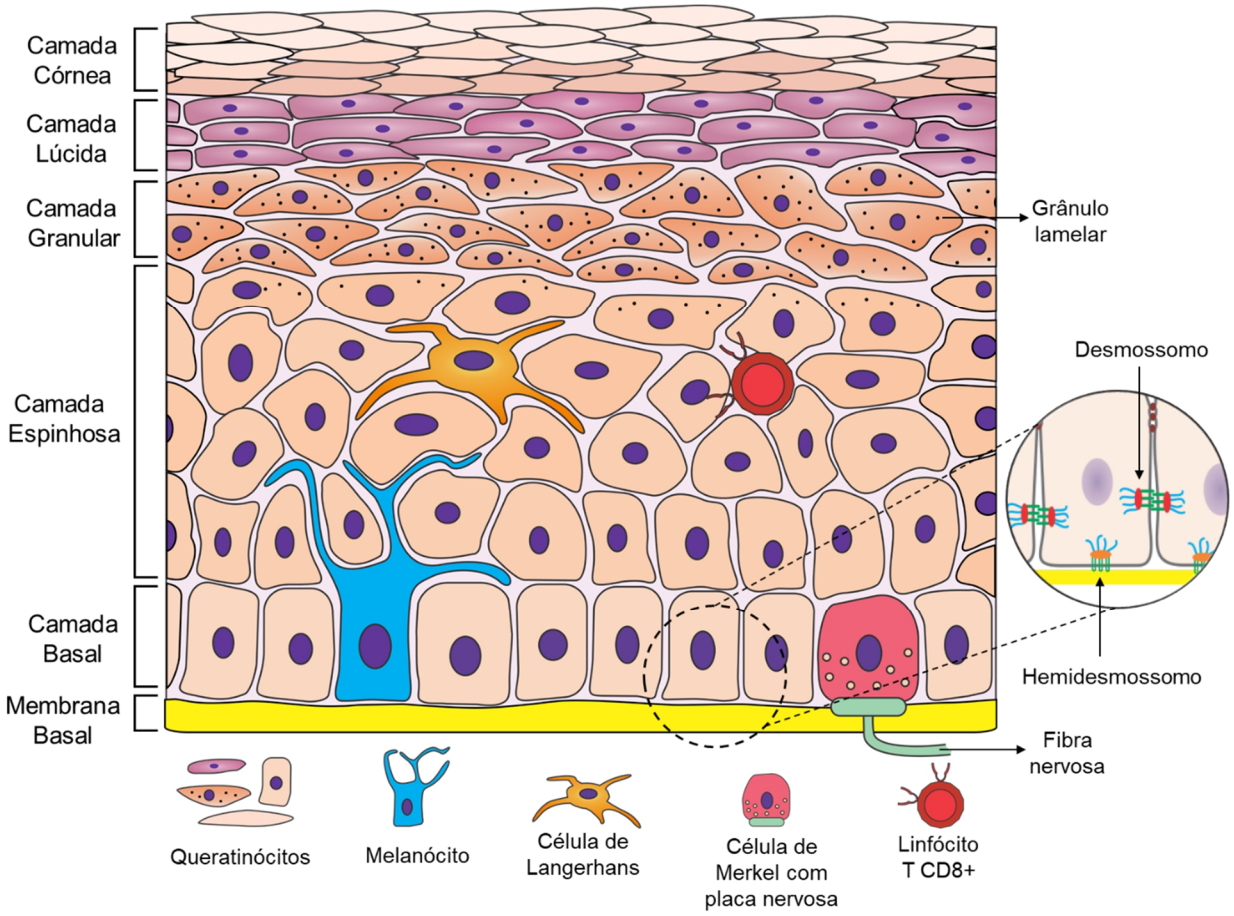


FONTE: A autora, 2021.

A camada lucida é melhor observada na pele grossa e tem uma camada muito fina de células achatadas, eosinofílicas, com núcleos e organelas digeridas por enzimas, desaparecendo. Por fim, a epiderme possui a camada córnea, composta de células anucleadas, mortas, achatadas e com citoplasma repleto de queratina. Nessa fase, os queratinócitos descamam e são responsáveis pela barreira da pele, impedindo a invasão por diferentes agentes (Losquadro, 2017; Junqueira, 2018).

Além dos queratinócitos, a epiderme é composta por células imunes residentes, como as células de Langerhans que atuam como apresentadoras de antígenos e interagem com linfócitos T CD8+ de memória (Kabashima *et al.*, 2019). Também observamos a presença dos melanócitos, responsáveis pela pigmentação, adjacentes a camada basal e das células de Merkel, envolvidas com as sensações táteis (Baroni *et al.*, 2012; Nguyen e Soulika, 2019). As células de Merkel são células semelhantes a queratinócitos, conectadas por desmossomos e apoiadas na membrana basal. São ligadas a uma estrutura em disco, uma placa nervosa, onde as fibras nervosas aferentes que atravessam a membrana basal se conectam (condução do impulso nervoso para o sistema nervoso central) (Junqueira, 2018). A figura 2 mostra uma ilustração da estrutura em camadas da epiderme e as células residentes mais comuns, além de evidenciar os desmossomos e hemidesmossos, responsáveis pela união dos queratinócitos.

Figura 2 – Estrutura da epiderme e suas células residentes



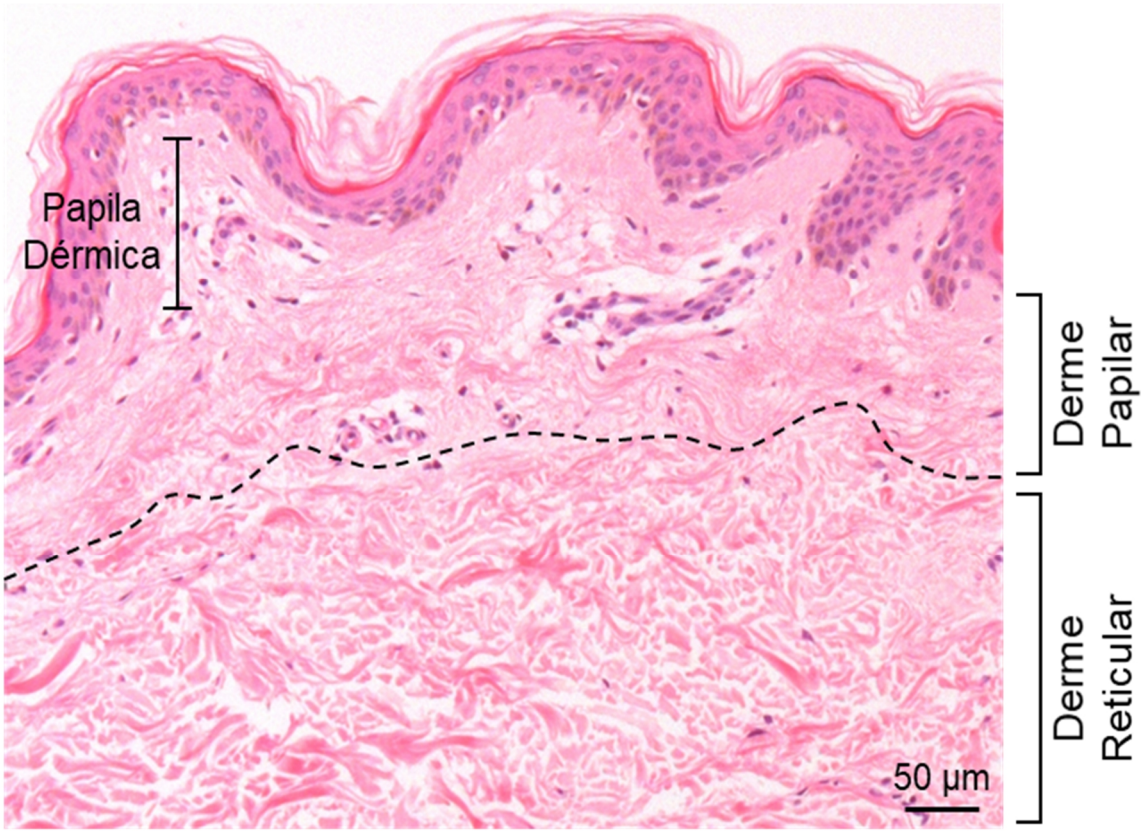
FONTE: A autora, 2021.

Abaixo da membrana basal há a derme, com espessura variável de acordo com a região do organismo. A derme confere a pele a resistência mecânica. É ricamente vascularizada, sendo responsável pela nutrição do tecido adjacente já que a epiderme é uma região avascular. Os fibroblastos são as células mais presentes na derme e são responsáveis pela produção da MEC, fibras colágenas e elásticas, conferindo a composição da estrutura do tecido. As fibras colágenas constituem até 95% da derme, e são organizadas por diferentes fibras de colágeno do tipo I e III (Syed *et al.*, 2011; Rippa *et al.*, 2019).

A derme é composta pelas regiões papilar e reticular. A camada papilar é adjacente a membrana basal (mais superficial) e rica em tecido conjuntivo frouxo, povoado por fibroblastos, fibras colágenas e fibras elásticas. Além disso, forma as papilas dérmicas, reentrâncias entre epiderme-derme. Na porção reticular há mais fibras colágenas e fibras do sistema elástico, sendo constituído por um tecido conjuntivo denso e por uma menor proporção de fibroblastos. As fibras elásticas na

derme papilar são mais espessas. No processo do envelhecimento, a derme papilar diminui de volume, sendo substituída pela reticular (Rippa *et al.*, 2019). A figura 3 mostra um corte histológico de pele fina humana, corada com H&E, onde é possível observar a delimitação entre a região papilar e reticular.

Figura 3 – Região papilar e reticular da derme humana



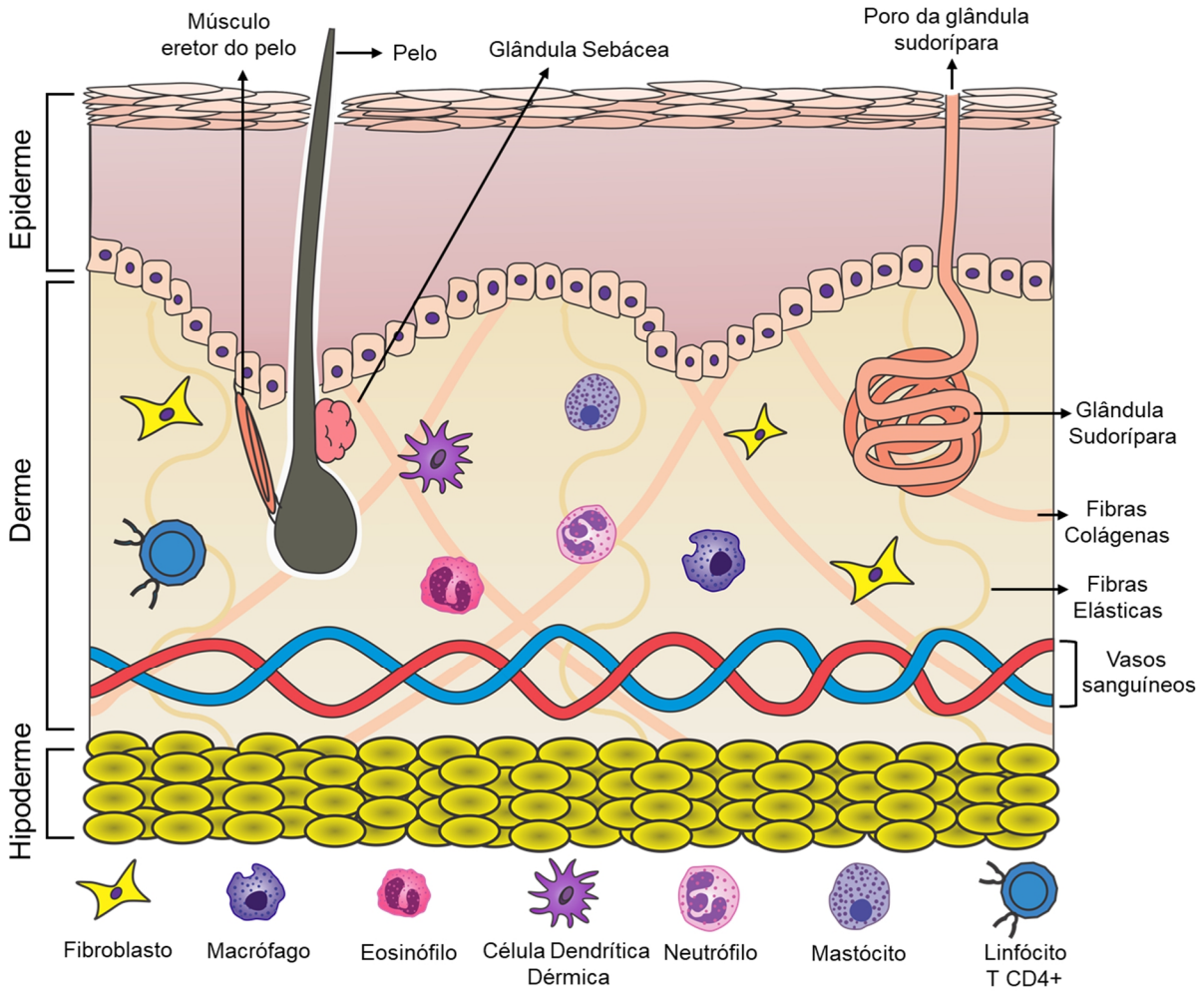
FONTE: A autora, 2021.

A derme também abriga estruturas anexas da pele, como as glândulas sudoríparas, os folículos pilossebáceos e o músculo eretor do pelo, também se encontram nos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e estruturas nervosas (Tsakovska *et al.*, 2017; Junqueira, 2018; Rivitti, 2018). Na derme, existem células imunes inatas como as células dendríticas dérmicas, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, linfócitos T CD4+, e um pequeno número de neutrófilos (Kabashima *et al.*, 2019).

A hipoderme está localizada abaixo da derme e não faz parte da pele. É um tecido subcutâneo formado por tecido adiposo e conjuntivo frouxo, unindo fracamente a derme e os órgãos subjacentes. Contém inúmeras células adiposas dependendo da região e da nutrição, constituindo o panículo adiposo (Junqueira, 2018). Tem espessura variável e, em geral, pode ser sede para porções secretoras das glândula,

de pelos, vasos sanguíneos e nervos. Funcionalmente, além de depósito nutritivo de reserva, participa do isolamento térmico e na proteção mecânica às pressões e traumas externos (Rivitti, 2018). A figura 4 resume a estrutura da derme, sua composição. células residentes e algumas estruturas anexas.

Figura 4 – Representação da estrutura da derme e suas células residentes



FONTE: A autora, 2021.

Além das funções de barreira, a pele possui funções endócrinas. A mais proeminente é a síntese de vitamina D. Os queratinócitos expressam receptores para vitamina D e são capazes de converter o 7-desidrocolesterol em sua forma ativa, a 1,25 dihidroxivitamina D com o auxílio da luz UV do sol. Além disso, junto com seu tecido adiposo, também pode ser classificada como um tecido esteroidogênico, pois expressa a enzima CYP11A1 (citocromo P450scc) necessária para o início da síntese de esteroides (Slominski *et al.*, 2015). Na pele, os andrógenos circulantes dehidroepiandrosterona e androstenediona são convertidos por diferentes vias em

testosterona ou androstenediona e, posteriormente, pelo andrógeno 5α-di-hidrotestosterona em regiões periféricas (Zouboulis, 2009).

Também estão presentes na pele os receptores nervosos sensoriais dos corpúsculos de Meissner (toque), corpúsculos de Pacini (pressão), corpúsculos de Ruffini (mecanorreceptores), terminais nervosos livres que também penetram na epiderme. A aparência geral, o turgor e outras qualidades da pele fornecem informações sobre a saúde geral do organismo (Slominski *et al.*, 2015).

1.1.2 Imunologia da Pele

Por ser um órgão mais exposto ao meio externo, a pele representa a primeira barreira de defesa do corpo. As células imunes da pele enfrentam grandes desafios e caso suas respostas sejam inadequadas, podem ocorrer exacerbação da resposta inflamatória e gerar doenças crônicas. No sistema imune, os linfócitos gerados circulam pelo sangue e viajam para órgãos linfoides, como linfonodos e o baço, fazendo a apresentação de antígenos e produzindo resposta imune direcionada (Kabashima *et al.*, 2019; Nguyen and Soulika, 2019).

Os queratinócitos, apesar de não serem células imunes, podem recrutar e ativar células imunes que produzem citocinas, afetam a proliferação celular e podem gerar uma rede inflamatória. Os queratinócitos podem secretar uma infinidade de citocinas, como as interleucinas (IL)-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, linfopoietina estromal tímica (TSLP), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interferon gama (IFN-γ), regulando a resposta inflamatória cutânea, reepitelização e restabelecendo a função de barreira epitelial (Wong *et al.*, 2016; Dainichi *et al.*, 2018). Além disso, expressam na superfície receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e receptores do tipo *toll* (TLR) que uma vez ativados, sinalizam o início de respostas inflamatórias (Gröne, 2002; Nedoszytko *et al.*, 2014; Nguyen e Soulika, 2019). Os queratinócitos expressam na sua superfície moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) auxiliando no reconhecimento de antígenos e tendo potencial para serem células apresentadoras de antígenos (APC). As APCs são importantes para o reconhecimento de antígenos, processamento e ativação de células T (Nestle *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2018). Os fibroblastos também possuem funções imunológicas estabelecidas, como a produção das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-25 em situações de traumas e estresse. Também são capazes de expressarem receptores PRRs que

auxiliam na indução e produção de citocinas (Nguyen e Soulika, 2019; Chieosilapatham *et al.*, 2021).

Os queratinócitos também são uma importante fonte de peptídeos antimicrobianos (AMPs), biomoléculas que participam da defesa da pele. São produzidos em locais onde há dano/ invasão de micro-organismos e induzem o rompimento das membranas bacterianas. Além dos queratinócitos, fibroblastos, células dendríticas e macrófagos são responsáveis por sua produção (Nestle *et al.*, 2009; Nguyen e Soulika, 2019). As famílias de AMP mais estudadas na pele humana são as β-defensinas e as catelicidinas (Nguyen e Soulika, 2019). A catelicidina mais estudada é a LL-37 e, juntamente com as β-defensinas, podem servir como alarminas para queratinócitos, induzindo proliferação e migração. Os AMPs no geral atuam como quimioatraentes para neutrófilos, macrófagos, células T de memória e células dendríticas imaturas (Tokumaru *et al.*, 2005; Nguyen e Soulika, 2019).

A pele também possui células imunes residentes que contribuem para a homeostase, secretando fatores de crescimento necessários para a sobrevivência dos queratinócitos e fibroblastos. Ademais, elas mantêm a função do tecido, fagocitando detritos, células apoptóticas e em condições inflamatórias. As células imunes residentes incluem as células dendríticas (DCs) como células de Langerhans (LC), células dendríticas dérmicas (DC dérmicas), macrófagos, mastócitos e eosinófilos. Os neutrófilos raramente são encontrados na pele saudável, porém povoam a pele em condições inflamatórias como na psoríase. As LCs e as DC dérmicas são células migratórias, viajam continuamente para os linfonodos da pele promovendo tolerância na homeostase ou para iniciam respostas imunes adaptativas (Nguyen and Soulika, 2019). Ambas são APCs e ativam os linfócitos T citotóxicos CD8+ e linfócitos T auxiliares CD4+. As APCs reconhecem e absorvem proteínas estranhas, transportando-as para os linfonodos, iniciando as respostas imunológicas e expansão de linfócitos para uma resposta imune direcionada (Abbas *et al.*, 2018; Kabashima *et al.*, 2019). Erros na interação entre queratinócitos residentes e células T podem ativar a inflamação e caminhos imunológicos responsáveis pelo início, progressão e persistência de doenças inflamatórias da pele como a dermatite atópica (Chieosilapatham *et al.*, 2021).

Os linfócitos T têm capacidade de reconhecer diferentes antígenos através dos seus receptores, servindo como repositório de memória imunológica, persistindo por décadas e fornecendo imunidade flexível. Na superfície da pele de um adulto existem

mais de 20 bilhões de linfócitos, número superior ao encontrado na circulação. Os linfócitos T virgens, ou *naives,* são encontrados na circulação e nos linfonodos, local onde encontram as DCs contendo antígenos. Uma vez apresentados aos antígenos, sofrem diferenciação e ganham funções efetoras, como a produção de citocinas e citotoxicidade. A maior parte dos linfócitos na pele são de memória (Clark, 2010).

Os linfócitos T formam populações com funções distintas, sendo as mais bem definidas as células T auxiliares (*helper*) e os linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T *helper* CD4+ secretam citocinas que estimulam a resposta imune, recrutando leucócitos e estimulando que estes eliminem micro-organismos. Os linfócitos citotóxicos CD8+ estão envolvidos na eliminação de células infectadas. Os diferentes linfócitos são distinguidos pela expressão de proteínas na superfície celular, chamadas por um número *CD* (cluster de diferenciação). As células T CD4+ *naives* podem se diferenciar em subpopulações em resposta específica a um antígeno ou citocinas e promover uma resposta mais direcionada, sendo as subpopulações principais chamadas de Th1, Th2 e Th17 (Abbas *et al.*, 2018). Na epiderme a maioria dos linfócitos são T CD8+ de memória, tendo uma proximidade com as LCs. Na derme, as células T estão preferencialmente agrupadas em torno das vênulas pós-capilares e logo abaixo da epiderme ou próximas às estruturas anexas (Nestle *et al.*, 2009).

Os macrófagos são encontrados na camada dérmica da pele. Depois da fase embrionária, a maior fonte de macrófagos dérmicos são os monócitos circulantes que amadurecem assim que adentram a pele, sendo responsáveis por remover detritos celulares. Evidências sugerem que os macrófagos desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase e integridade da pele, auxiliando na cicatrização de feridas, no reparo de tecidos e na resposta ao estresse (Yanez *et al.*, 2017).

Os mastócitos são as células residentes mais presentes na derme. São rapidamente ativadas após estímulos, liberando uma variedade de mediadores pré-formados como histamina, proteases, triptase e citocinas como TNF-α. Depois de ativados, os mastócitos ainda podem secretar outros mediadores como prostaglandinas e leucotrienos (Wilgus e Wulff, 2014; Voss *et al.*, 2021). Os mastócitos expressam receptores de alta afinidade a IgE (FcεRI) que se ligam a anticorpos imunoglobulina E (IgE) solúveis produzidos por linfócitos B após a sensibilização a um alérgeno específico. Também, são o principal depósito de histamina, uma amina bioativa que conduz as reações alérgicas e anafilaxia. Uma importante função dos mastócitos é a comunicação com outras células, por exemplo os fibroblastos, que são

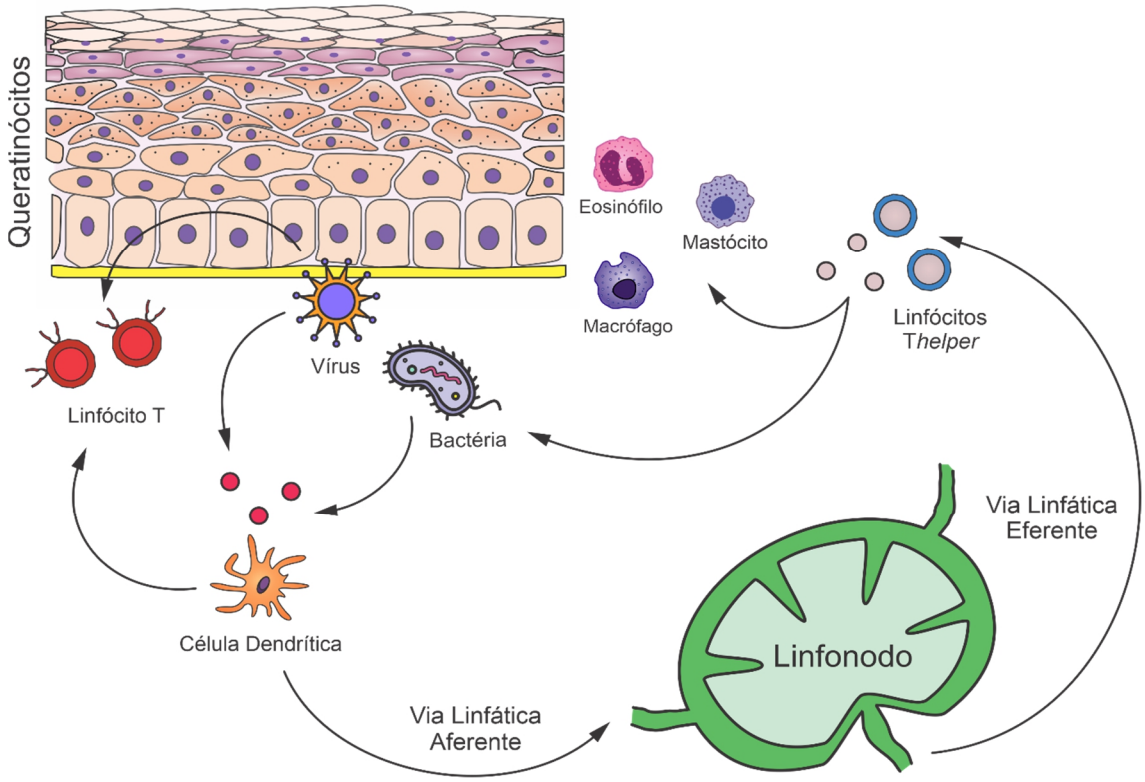
estimulados através de IL-4, IL-13 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Voss *et al.*, 2021). Os mastócitos têm efeitos inibitórios e ativadores sobre os queratinócitos. Eles podem expressar fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de ativação de plaquetas (PAF) que ativam os queratinócitos. Já a liberação de histamina, heparina e outros mediadores, inibe a proliferação dos queratinócitos, controlando a regeneração epidérmica. A histamina é o principal mediador que leva a dilação e permeabilização dos vasos sanguíneos, levando a edema local. As citocinas e quimiocinas como TNF, IL-6, CXCL1 e eotaxinas são responsáveis pelo recrutamento precoce de neutrófilos e, devido a permeabilidade, impactam no recrutamento de outras células imunes para o local da inflamação. Além dessas funções, os mastócitos podem afetar as DCs, através de TNF e histamina, promovendo a ativação e a migração dessas células. Os mastócitos têm sido implicados no aparecimento de dor neuropática, coceira e prurido, sendo este último alguns dos principais sintomas da psoríase (Voss *et al.*, 2021).

Os eosinófilos estão envolvidos na defesa do hospedeiro, expressando diferentes receptores, como TLR, quimiocinas, citocinas e outros. A estimulação desses receptores leva a liberação de seus grânulos que são repletos de proteínas potentes e tóxicas, como a proteína básica principal (MBP), peroxidase de eosinófilos (EPO), neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN) e proteína catiônica eosinofílica (ECP). Assim como os mastócitos, os eosinófilos produzem leucotrienos e prostaglandinas (Nguyen e Soulika, 2019). Os eosinófilos funcionam como células imunomoduladoras por serem associados a linfócitos Th2, respondendo à IL-5 e secretando IL-4, IL-9 e IL-13, afetando outros linfócitos Th2, células B e macrófagos. Além disso, podem atrair neutrófilos por liberarem GM-CSF e IL-8, além de terem relação com prurido por serem fonte de IL-31, importante em doenças como a dermatite atópica (Radonjic-Hoesli *et al.*, 2021).

A figura 5 mostra um resumo da resposta imune na pele. A invasão de micro-organismos (vírus ou bactérias), pode ativar diretamente os linfócitos T residentes da pele e/ou serem reconhecidos por DCs que farão o reconhecimento, processamento desses antígenos. Após o processamento, as DCs migram até os linfonodos, pela via aferente e apresentam o complexo peptídeo-MHC para as células T *naives,* causando sua diferenciação em linfócitos T específicos. Os linfócitos migram pela via eferente linfática até o local do processo inflamatório, proporcionando uma resposta

imunológica por secretar citocinas específicas e recrutam leucócitos para destruição dos agentes invasores e restabelecimento da estrutura da pele.

Figura 5 – Ativação do sistema imune na pele



FONTE: A Autora, 2021.

Na pele, o agrupamento de leucócitos representa uma estrutura local de apresentação de antígenos, denominada tecido linfoide associado à pele (SALT, do inglês *skin-associated lymphoid tissue*). Apesar de ser um termo conceitual, é uma estrutura real, aparecendo transitoriamente ao redor das vênulas pós-capilares em resposta a vários estímulos imunogênicos. O SALT é composto por diferentes células inflamatórias, como macrófagos, DCs dérmicas e células T. Após a resposta imune na pele, as DCs dérmicas exibem aglomerados ao redor das vênulas pós-capilares em poucas horas. Citocinas produzidas por queratinócitos ativam macrófagos ao redor das vênulas que auxiliam no recrutamento de DCs. Na psoríase, uma estrutura semelhante ao SALT foi relatada nas lesões de pele em humanos, mostrando que o SALT pode servir como uma estrutura importante no desenvolvimento de respostas imunológicas em outras doenças inflamatórias da pele (Kabashima et al., 2019; Egawa e Kabashima, 2020).

1.2 Dermatite Atópica

A dermatite atópica (DA), também conhecida como eczema, é uma doença que tem início na infância e normalmente tem auto resolução até a fase adulta. Entretanto, uma significante parte dos casos persistem na fase adulta. As lesões em crianças são localizadas nas bochechas, pescoço, tronco e áreas extensoras, sendo lesões avermelhadas, com bordas indistintas entre a pele afetada e não afetada, provocando prurido intenso e descamação. As feridas são úmidas e podem ser colonizadas por diferentes micro-organismos (Guttman-Yassky e Krueger, 2017; Kapur *et al.*, 2018). Os pacientes adultos, especialmente que tiveram início ou recorrência na idade adulta, tem predileção por lesões na cabeça/pescoço, mãos e pés (Sacotte e Silverberg, 2018). As coceiras provocadas pelas lesões pioram no período noturno e independe da idade do paciente (Kapur *et al.*, 2018). As lesões causam estigma social aos pacientes, o que leva a perda da qualidade de vida, com profundo impacto psicossocial e econômico, podendo ocasionar distúrbios do sono e quadros depressivos (Coghi *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2021; Milanesi *et al.*, 2021).

As características histopatológicas das lesões na DA incluem: a espongiose (acúmulo de líquido, levando à formação de vesículas), acantose (espessamento da camada espinhosa), a hiperqueratose ortoqueratótica (aumento da camada córnea com queratinócitos anucleados) e o infiltrado celular de eosinófilos e mastócitos na derme (Guttman-Yassky *et al.*, 2011). Os efeitos prejudiciais da DA não se resumem apenas a pele, sendo alguns pacientes detentores de elevados níveis de IgE, que é associado a características alérgicas como a rinite, asma e alergias alimentares, chamado de marcha atópica. Além da relação com as alergias, os afetados podem sofrer obesidade, problemas cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, complicações oculares, osteoporose, fratura de osso e doenças articulares. Muitas dessas comorbidades estão relacionadas à gravidade da DA e ao controle insatisfatório da doença a longo prazo (Guttman-Yassky *et al.*, 2018; Sacotte e Silverberg, 2018).

A DA pode afetar mundialmente mais de 30% das crianças, tendo uma prevalência de 9,8% nos Estados Unidos, 15,3% no Reino Unido e a menor de 2,7% em Israel. Na América Latina, o Brasil tem a maior prevalência, sendo de 20,1% (Sacotte e Silverberg, 2018; Silverberg *et al.*, 2021). Estudos internacionais sobre a DA em adultos encontraram prevalência de até 9,7% que variam por região, chegando afetar até 34,1% dos adultos de até 30 anos na Escandinávia (Bylund *et al.*, 2020).

A patogênese da DA é atribuída a um desequilíbrio no sistema imune adaptativo e a um desbalanço na barreira da pele, incluindo a disfunção das células T *helper* (Th) e aumento da produção de IgE (Dhingra *et al.*, 2013; Guttman-Yassky e Krueger, 2017). A barreira cutânea nestes pacientes possui anormalidades, com provável associação a mutação em genes como da filagrina, uma proteína necessária para a estrutura da pele. A pele acometida também é deficiente na expressão de AMP como a catelicidinas (reduzida também pelas citocinas IL-4 e IL-13). Todas essas anormalidades levam a perda de água transepidérmica, facilitando a entrada de alérgenos e micro-organismos na pele. É comum a colonização por *Staphylococcus aureus* nas lesões de DA (Guttman-Yassky *et al.*, 2018; Kapur *et al.*, 2018).

O comprometimento da barreira cutânea junto com a colonização por micro-organismos promove a liberação de citocinas pelos queratinócitos, como IL-25, IL-33 e TSLP que estimulam as LC e as DC dérmicas a ativarem linfócitos Th2, liberando IL-4, IL-13 e IL-31. (Dainichi *et al.*, 2018; Guttman-Yassky *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2021). Os linfócitos Th2 e Th22 são as populações mais ativas na maioria dos subtipos de DA e estão envolvidos na ativação de células dendríticas (Guttman-Yassky e Krueger, 2017). As células dendríticas na DA possuem alta expressão do receptor para TSLP e para o ligante OX40L, responsáveis por direcionar a polarização Th2 dos linfócitos através da expressão induzida de OX40 nas células T ativadas. Outra característica de células dendríticas *atópicas* é a alta expressão do FcεR que é uma conexão para a inflamação alérgica (Guttman-Yassky e Krueger, 2017; Dainichi *et al.*, 2018). A histamina liberada pelos mastócitos, o TSLP e a IL-31 estimulam os nervos sensoriais, provocando prurido intenso no local da lesão (Furue, 2021; Wong *et al.*, 2021).

No estágio crônico da DA, as células dendríticas também produzem IL-23 que ativa resposta Th17 e podem produzir IL-12, responsável pela ativação da resposta Th1. As citocinas produzidas por linfócitos Th2, Th17 e Th22 (IL-4/IL-13 e IL-17/IL-22, respectivamente) vão atuar inibindo a diferenciação terminal da epiderme, intensificando a quebra da barreira epitelial, criando um mecanismo de autoalimentação (Guttman-Yassky e Krueger, 2017; Dainichi *et al.*, 2018). A resposta da hiperplasia epidérmica na DA crônica é impulsionada diretamente pela IL-22 que também contribui para a ativação de STAT3 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), aumentando a proliferação de queratinócitos nucleados (hiperplasia) na epiderme. Esse mecanismo também pode acontecer pela indução

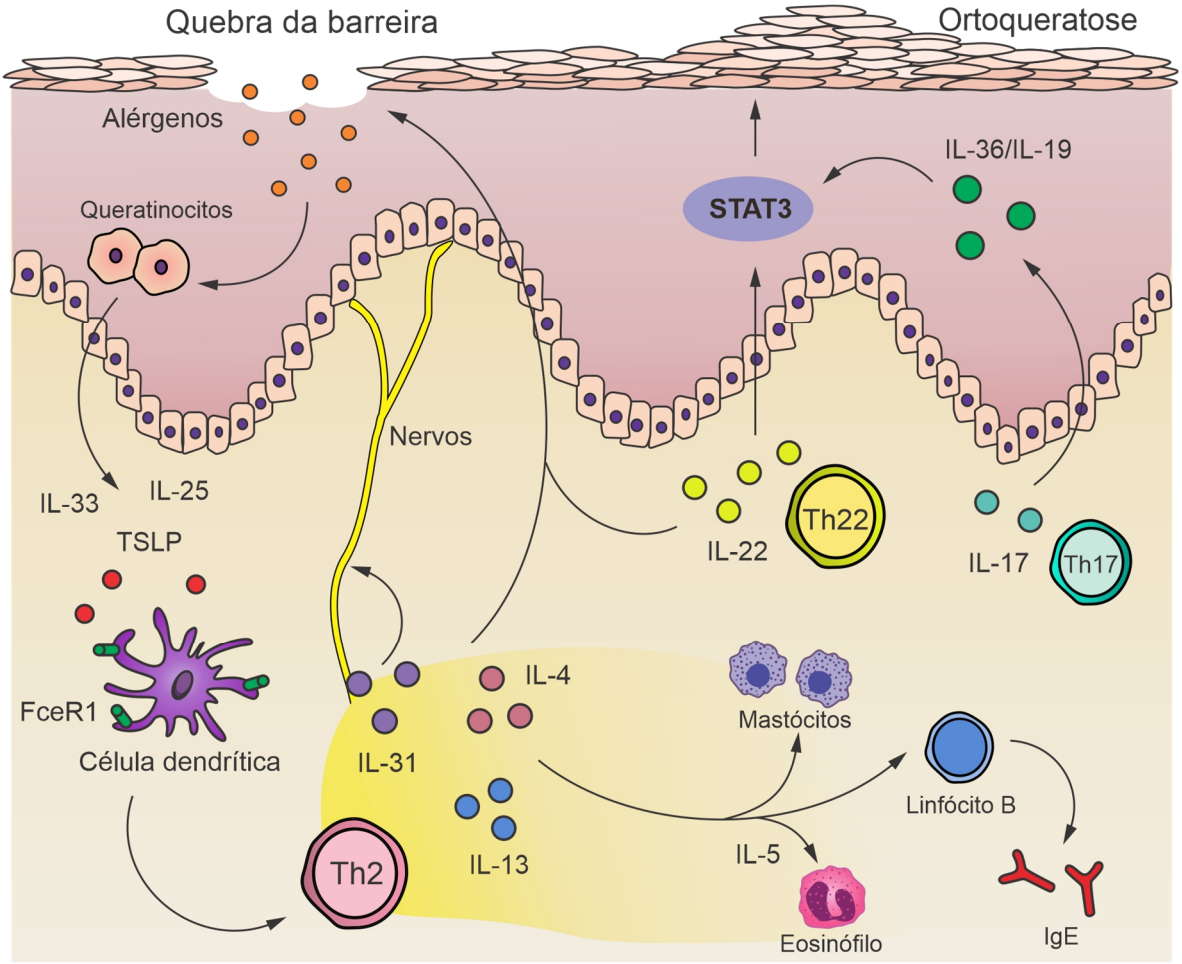
indireta da IL-17, que aumenta a produção de IL-19 ou IL-36 (Guttman-Yassky e Krueger, 2017). A alta produção de IgE na DA, como nas reações alérgicas, é impulsionada por IL-14 e IL-13 e a IL-5 é principal responsável pelo recrutamento/ manutenção de eosinófilos no local da lesão (Oldhoff *et al.*, 2005; Dainichi *et al.*, 2018).

A DA é uma doença complexa, possuindo alguns subtipos como a associação a IgE (DA extrínseca) ou não (intrínseca, sendo menos comum). Outras classificações incluem a DA pediátrica que possui apenas linfócitos Th2 no sangue, mas as lesões cutâneas têm ativação robusta de populações de células Th2, Th17 e Th22. Já a DA Europeia-Americana tem o eixo Th17 diminuído quando é extrínseca (depende de IgE), mas permanece aumentado na DA intrínseca (sem ação de IgE). Entretanto, a DA asiática tem características semelhantes da psoríase, com forte ativação de linfócitos Th2, Th17 e Th22 nas lesões, assim como na DA pediátrica, distinguindo dessa pela ativação de linfócitos Th1 (Guttman-Yassky e Krueger, 2017; Brunner e Guttman-Yassky, 2019).

O tratamento para a DA pode ser complicado devido aos múltiplos eixos que contribuem para as características da doença. O tratamento pode ser feito com emolientes, corticoides como a dexametasona, fototerapias e imunossupressores tais como ciclosporina A, que são eficientes na redução da inflamação, mas causam efeitos adversos, como a toxicidade renal, surgimento de neoplasias malignas na pele e recaídas com o abandono dos tratamentos (Luger *et al.*, 2015; Guttman-Yassky *et al.*, 2018). Os novos tratamentos promissores incluem agentes biológicos que são os anticorpos monoclonais. Um caso curioso é que apesar da existência de um eixo Th1 em alguns quadros de DA, o tratamento com inibidores de TNF não se mostraram úteis e podem até exacerbar os sintomas, como o Infliximabe e o Etanercept (Buka *et al.*, 2005; Jacobi *et al.*, 2005). A administração do antagonista monoclonal de IL-5 Mepolizumabe em pacientes com DA reduz a eosinofilia periférica, mas não é o suficiente para melhorar o quadro da doença (Oldhoff *et al.*, 2005). O uso do Dupilumabe tem resultados notáveis contra a DA. Esse anticorpo bloqueia a subunidade alfa do receptor IL-4, bloqueando a ação de IL-4 e IL-13, principais citocinas do eixo Th2. Esse tratamento também reduz os níveis de IgE nas primeiras semanas de tratamento, mas infelizmente não impede a resposta alérgica. Apesar dos efeitos, aproximadamente 60% dos pacientes têm resultados positivos, o que evidencia que a DA atua por múltiplos eixos, sendo interessante que tratamentos futuros utilizem o bloqueio de diferentes eixos, como Th22 e potencialmente Th17, por

aturem em diferentes tipos de DA (Guttman-Yassky e Krueger, 2017; Guttman-Yassky *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2021). A figura 6 resume os principais eventos na patogênese da DA.

Figura 6 – A patogênese da DA. A quebra da barreira epitelial facilita a entrada de alérgenos na pele que ativam queratinócitos a secretarem fatores como IL-25, IL-33 e TSLP, ativando as DCs e liberando IL-4, IL-13 e IL-31. A IL-4 e IL-13 são as principais envolvidas com a cronicidade da DA, pois ativam queratinócitos, facilitando a perda de água pela epiderme e recrutando células inflamatórias como mastócitos, eosinófilos e aumentando a produção de IgE. As DCs na DA expressam receptores FcεR que se ligam a IgE, relacionado às reações alérgicas. As citocinas Th17 e Th22 também estão envolvidas, aumentando a espessura da epiderme por indução da STAT3 e promovendo a hiperproliferação de queratinócitos anucleados, evento nomeado de ortoqueratose. A IL-31 na DA é a principal citocina envolvida com os sintomas de prurido por ativar os nervos cutâneos, característica marcante da doença.



FONTE: A autora, 2021.

Um possível tratamento mais recente utiliza o Nemolizumabe, anticorpo monoclonal humano contra o receptor IL-31RA, envolvido no prurido e na inflamação (Kabashima *et al.*, 2020). Nos ensaios clínicos, os pacientes tiveram redução do prurido e seu uso com corticoides intensificou os efeitos. O Nemolizumabe foi capaz de diminuir a gravidade da dermatite, reduzir distúrbios do sono, melhorar a qualidade de vida e comprometimento da produtividade/atividade no trabalho (Furue, 2021).

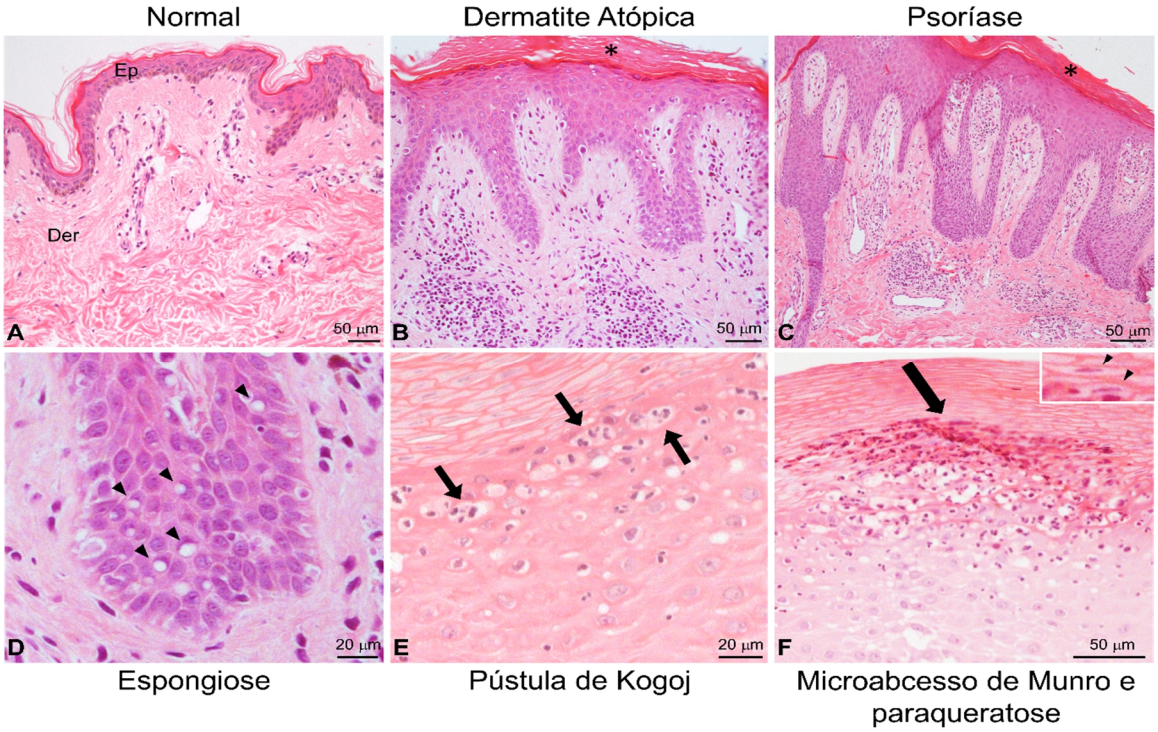
1.3 Psoríase

A psoríase (Ps) é uma doença inflamatória crônica da pele com forte predisposição genética e até mesmo ação do envelhecimento. Fatores ambientais, trauma, infecção e drogas podem influenciar o desenvolvimento da doença (Petit *et al.*, 2021). Os produtos genéticos envolvidos na inflamação da Ps representam uma parte consistente da suscetibilidade genética, estabelecida progressivamente por numerosos estudos genômicos nos últimos anos, com a identificação de loci genéticos de risco de psoríase, denominados PSORS 1-9, explicando seu perfil imunológico peculiar (Chiricozzi *et al.*, 2018). As lesões características são placas eritematosas com descamação prateada, bem demarcadas e com diferentes graus de prurido, acometendo também unhas das mãos e pés (Guttman-Yassky *et al.*, 2018). As regiões acometidas mostram distribuição simétrica, envolvendo comumente o couro cabeludo, região sacral, superfície extensora dos cotovelos e joelhos (Dainichi *et al.*, 2018). A prevalência da Ps pode atingir até 11% da população de alguns países como a Noruega e cerca de 1,3% da população brasileira (Michalek *et al.*, 2017).

O pico de início das manifestações dos sinais de Ps é na fase adulta, por volta dos 30-39 anos (Dainichi *et al.*, 2018). Cerca de 30% dos acometidos podem desenvolver artrite psoriática, envolvendo entese (endurecimento) de articulações ou mesmo da coluna vertebral. Além da artrite psoriática, a Ps é cada vez mais reconhecida como uma doença multissistêmica, podendo ocorrer a síndrome metabólica, obesidade, doença inflamatória intestinal (doença de Crohn), distúrbios cardiovasculares e transtornos psicológicos/psiquiátricos como ansiedade e depressão (Oliveira *et al.*, 2015). Observando a histologia das lesões na Ps, o espessamento da epiderme é um dos eventos histológicos mais importantes e ocorre pela proliferação descontrolada dos queratinócitos (Dainichi *et al.*, 2018). A característica desse epitélio é o alongamento das cristas epidérmicas, com

alargamento bulboso, pústulas espongiformes de *Kogoj* formadas pela migração de neutrófilos com agregação abaixo do estrato córneo e à medida que esses neutrófilos migram para o estrato córneo, se tornam picnóticos e formam os microabscessos de *Munro* (Murphy et al., 2007). As lesões, diferente da DA, são secas, e normalmente não provocam coceira excessiva. A hiperqueratose que ocorre é do tipo paraqueratótica, onde os queratinócitos mais externos são nucleados (Guttman-Yassky *et al.*, 2011). A figura 7 exemplifica os achados histológicos que ocorrem tanto na DA como na Ps, na coloração por H&E.

Figura 7 – Características histológicas da DA e Ps. A: pele normal, epiderme (Ep) e derme (Der) de aspecto saudável, sem espessamento da epiderme e infiltrado inflamatório na derme. B: Dermatite Atópica. É possível observar o espessamento epidérmico e infiltrado inflamatório na derme. C: Psoríase. É possível observar espessamento epidérmico por aumento das células espinhosas (acantose), as projeções da epiderme com alongamento das cristas epidérmicas e a presença de infiltrado inflamatório. D: Espongiose na epiderme (cabeça de setas), caracterizada por edema intercelular. E: Pústula de Kogoj, causada pela infiltração de neutrófilos na epiderme. F: Microabcesso de Munro, neutrófilos picnóticos provenientes da pústula de Kogoj. No detalhe, o fenômeno da paraqueratose é evidenciado (cabeça de setas para o núcleo das células). *: hiperqueratose. Coloração H&E.



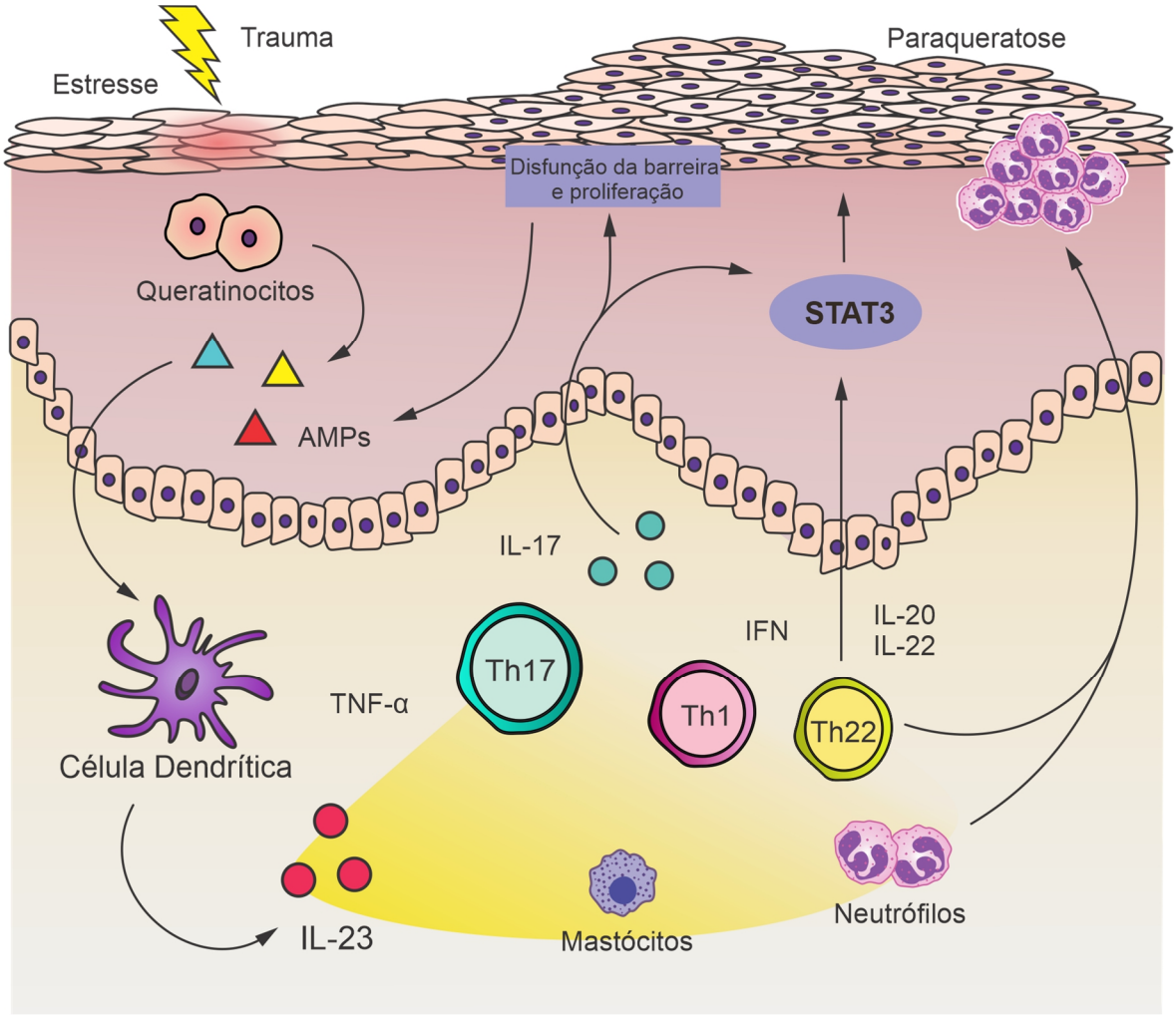
FONTE: A autora, 2021.

A patogênese da Ps não é totalmente esclarecida. Uma das vias propostas ocorre por diferentes gatilhos (patógenos, estresse ou traumas) que estimulam os queratinócitos a secretarem AMPs. Esses queratinócitos na Ps secretam especialmente a LL-37, β-defensinas e proteínas da família S100. A LL-37 é a principal responsável por ativar receptores como TLR9, ativando células dendríticas que secretam TNF-α e IL-23 (Rendon e Schäkel, 2019). A IL-23 é a principal estimuladora da produção de linfócitos Th17, além de também estimular mastócitos e neutrófilos, a secretar IL-17. Outras citocinas derivadas de linfócitos Th1, Th22 e queratinócitos como IL-19, IL-20, IL-22, IL-36, IFN-γ e quimiocinas CCL20, CXCL1 e CXCL8 também contribuem para o desenvolvimento da Ps (Chiricozzi *et al.*, 2018). Estas citocinas junto da IL-17 ativam fatores de transcrição como STAT1, fator nuclear *kappa* B (NFκB) e proteínas da família C/EBP (ligante CCAAT/potenciador) nas células residentes da pele, principalmente queratinócitos, criando resposta inflamatória que se auto amplifica (Guttman-Yassky e Krueger, 2017).

A IL-17 também ativa, por via indireta, a STAT3 através do estímulo de IL-19/IL-36, responsáveis por sua ativação na epiderme. O mesmo pode ocorrer através da IL-22 e IL-20 de forma direta por serem também ativadoras da STAT3 (Guttman-Yassky e Krueger, 2017). A resposta da epiderme na Ps é caracterizada, principalmente, pela via inflamatória IL-23 – Th17, onde a IL-23 conduz a expansão das células Th17 (Rendon e Schäkel, 2019). O TNF-α possui duas funções, ativar as células dendríticas para a síntese de IL-23 e fazer sinergia com a IL-17 para a indução de muitos genes relacionados à Ps em queratinócitos. Assim, um antagonista da via IL-23/Th17 representa um antagonista indireto do TNF-α (Guttman-Yassky e Krueger, 2017). Além disso, muitos alelos de risco codificam proteínas que direcionam a diferenciação dos linfócitos Th17. Assim, consideramos que a Ps é um exemplo de imunidade polarizada para Th17, sendo consolidada pela observação de que aproximadamente 90% dos pacientes com Ps podem ser tratados por antagonistas específicos de IL-17 (Guttman-Yassky e Krueger, 2017). A figura 8 mostra um resumo da patogênese da Ps.

Figura 8 – Patogênese da Ps. Após diferentes gatilhos, os queratinócitos secretam AMPs que ativam as DCs para produção de TNF-α e IL-23. A IL-23 estimula a proliferação de linfócitos Th17, além de ativar mastócitos e neutrófilos. Os linfócitos Th1 e Th22 auxiliam na disfunção da barreira epitelial e aumento da espessura da

epiderme através da ativação da STAT3. Na Ps, os queratinócitos proliferam numa taxa rápida, ainda possuindo núcleo quando chegam na camada externa, resultando na paraqueratose. As citocinas atuantes na Ps auxiliam na migração de neutrófilos para epiderme, sendo comum encontrá-los nessa região em pacientes com Ps.



FONTE: A autora, 2021.

Os tratamentos para a Ps requerem uma terapia a longo prazo. A escolha é devido a gravidade e a comorbidades presentes. Os pacientes são classificados em dois grupos, leve ou moderada, ou grave, dependendo da gravidade clínica das lesões, da porcentagem da área de superfície corporal afetada e a qualidade de vida do paciente. O escore PASI (grau de severidade do processo psoriático) é amplamente utilizado em ensaios clínicos, especialmente aqueles pertencentes ao desenvolvimento de drogas biológicas. A Ps leve a moderada pode ser tratada com glicocorticoides, fototerapia e imunomoduladores, como a ciclosporina. Infelizmente esses tratamentos podem ter efeitos colaterais como toxicidade renal, câncer e

náuseas (Rendon e Schäkel, 2019). Na atualidade, novas estratégias vêm sendo adotadas para tratar os casos graves. Muitos dos novos agentes são biológicos, principalmente anticorpos monoclonais que têm como alvo as principais vias das citocinas. Inibidores do TNF-α, incluindo Etanercepte e Infliximabe vem sendo usados para tratar a Ps (Guttman-Yassky *et al.*, 2018). O Ustekinumabe é um tratamento aprovado para Ps, onde se liga a sua subunidade p40 da IL-23, impedindo a ativação de linfócitos Th17. É uma terapia que mostrou eficácia de aproximadamente 70% em 12 semanas de tratamento (Noda *et al.*, 2015).

1.4 Dermatite Atópica x Psoríase

Os queratinócitos são o principal alvo das doenças de pele como a Ps e DA. Os queratinócitos da linhagem HaCaT são imortalizados, oriundos da pele normal de um adulto e exibem diferenciação normal, representando uma ferramenta de estudo da regulação de células humanas. São semelhantes aos queratinócitos normais, mantendo as queratinas específicas de diferenciação, K1 e K10 e outros marcadores como involucrina e filagrina (maior componente dos grânulos de querato-hialina) expressos e regularmente localizados. Além disso, permanecem não tumorigênicas e não invasivas *in vivo*. Seu nome mostra sua origem a partir de queratinócitos da pele humana, cultivados sob baixas condições de Ca^{2+} (cálcio) e temperatura elevada (Boukamp *et al.*, 1988).

Embora a DA e a Ps sejam clinicamente diferentes, seus estágios crônicos têm muitas semelhanças histológicas, incluindo hiperplasia epidérmica aumentada e grande infiltrado de linfócitos T e DCs. Em estudos genômicos, foi possível observar que genes envolvidos na regulação da proliferação de células epidérmicas são supra regulados em ambas as doenças (Guttman-Yassky *et al.*, 2011). Além disso, um subconjunto de pacientes com Ps tem lesões que se parecem com a DA, ou seja, não apresentam as características típicas de forte descamação da Ps. Também, quando observados os processos de patogênese de doenças na pele, há muitas sobreposições e semelhanças na ativação de células imunes, alterações resultantes na estrutura e função do tecido, particularmente quando se considera as formas intrínsecas, asiáticas e pediátricas de DA (Guttman-Yassky e Krueger, 2017).

Devido a essas sobreposições, o seguinte trabalho busca analisar o papel de proteínas endógenas como possíveis biomarcadores para DA e Ps, e compreender

suas funções durante o processo inflamatório. Nesse contexto, destacamos as galectinas, descritas no próximo tópico.

1.5 Galectinas

As lectinas são proteínas de ligação a carboidratos que reconhecem uma diversidade de estruturas de polissacarídeos em diversos glicoconjugados (Chan *et al.*, 2018). Elas podem atuar como sinais, receptores e elementos estruturais em microambientes intracelulares e extracelulares (Farhadi e Hudalla, 2016). Como resultado, a ligação lectina-glicano pode iniciar, amplificar, atenuar ou inibir a transdução de sinal transmembrana para modular a proliferação celular, diferenciação, migração, apoptose e imunidade e tolerância em vários processos normais e patológicos (Farhadi e Hudalla, 2016; Chan *et al.*, 2018).

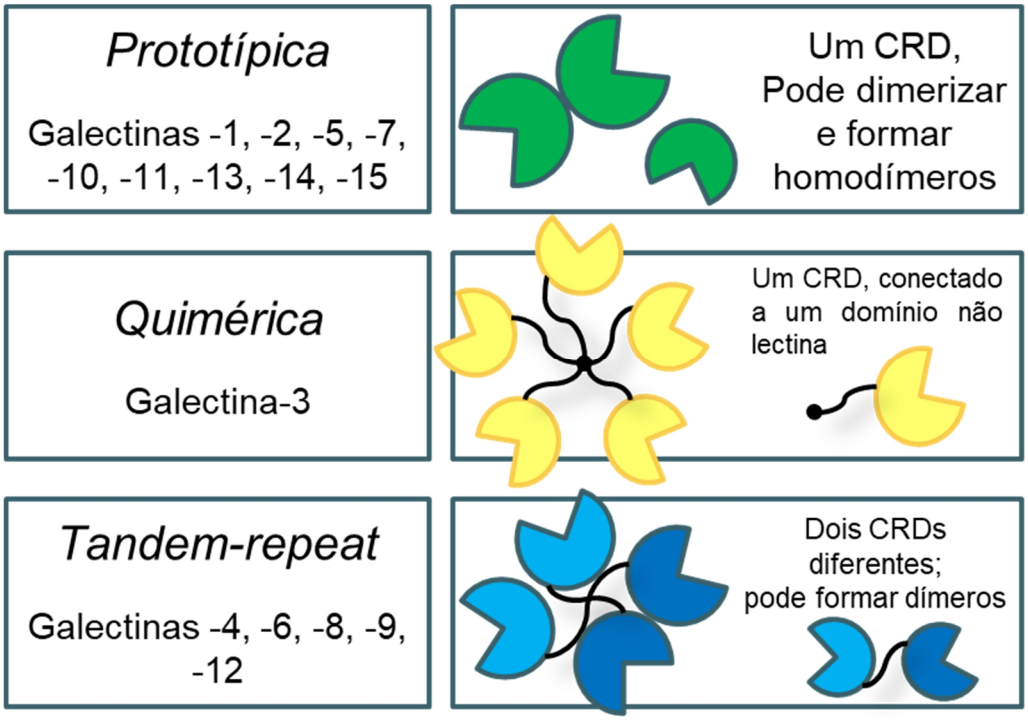
As galectinas (Gals) são membros da família das lectinas, são pequenas proteínas citosólicas que se ligam aos resíduos β-galactosídeos e compartilham uma sequência de aproximadamente 135 aminoácidos em seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRDs) onde ocorre a ligação com os glicanos. A descoberta das Gals ocorreu através do isolamento de uma proteína chamada de eletrolectina, isolada da enguia elétrica e, após estudos subsequentes, foi reconhecida como o primeiro membro descrito da família (Teichberg *et al.*, 1975; Kamili *et al.*, 2016). As Gals estão presentes em todos os metazoários, tornando-as uma das famílias de ligantes de glicanos evolutivamente mais antigas expressas em mamíferos (Kamili *et al.*, 2016).

Quinze membros da sua família já foram identificados em mamíferos e nomeados de acordo com sua organização estrutural e ordem de descoberta, sendo categorizadas em três subfamílias: prototípica, quimérica e repetição em tandem (Chan *et al.*, 2018). A subfamília prototípica inclui as Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15, onde cada Gal contém um único CRD que podem homodimerizar, tendo uma função bivalente quanto a sua ligação aos carboidratos. A subfamília do tipo repetição em tandem (*tandem repeat*) incluem as Gal-4, -6, -8, -9 e -12. Cada uma contém dois CRDs diferentes em cada extremidade da cadeia polipeptídica e possuem função bivalente com esses dois locais para ligação aos carboidratos. A subfamília do tipo quimera possui apenas um membro, a Gal-3, composta por um domínio não lectina N-terminal ligado a um CRD podendo assumir forma homotípica múltipla, como um

pentâmero, que pode se ligar a carboidratos multivalentes (Chan *et al.*, 2018; Johannes *et al.*, 2018).

Na superfície de membranas, as Gals são capazes de fazer ligação com os glicanos de glicolipídeos ou glicoproteínas por intermédio do seu CRD, podendo fazer um *crosslink*, ou seja, formando redes necessárias para que haja a transmissão de sinais. Interessantemente, as Gals são monoméricas em soluções com concentrações fisiológicas, e a maioria é capaz de se agregar formando redes (Johannes *et al.*, 2018). Por exemplo, a Gal-1 possui um dímero fraco, mas após a ligação a sua dimerização aumenta (Salomonsson *et al.*, 2010). Já a Gal-3 existe como um monômero e pode agregar e se unir na sua região N-terminal não CRD (Ahmad *et al.*, 2004; Nieminen *et al.*, 2007). A maior parte das funções da Gal-3 depende da oligomerização da região N-terminal, e a remoção dessa região impede a Gal-3 de exercer as suas funções (Pelletier e Sato, 2002). As Gals com dois CRD distintos, como no grupo *tandem-repeat,* também podem formar dímeros (Kamili *et al.*, 2016). A ligação das Gals pode modular receptores, ativando linfócitos T, promovendo a secreção de citocinas, ativação de neutrófilos ou ativando a apoptose. Também pode regular a proliferação, diferenciação e sobrevida de células (Vasta *et al.*, 2012). A figura 9 exemplifica os subgrupos das galectinas descritas em mamíferos até o momento.

Figura 9 - Estrutura das Galectinas.



FONTE: A autora, 2021

As Gals são encontradas no citosol, núcleo, matriz extracelular ou na circulação. Os seus transcritos são traduzidos nos ribossomas livres no citoplasma da célula e as proteínas podem ser translocadas para o núcleo onde se associam com as ribonucleoproteínas. Através de mecanismos não convencionais, as Gals são secretadas para o espaço extracelular e podem ter diferentes atuações. Entre elas: receptores para glicanos de micro-organismos, ligação com glicanos da superfície celular da célula hospedeira, ou formar redes entre elas e os glicanos da MEC, promovendo a migração celular. Elas também podem formar redes com os glicanos da superfície celular e desencadear cascatas de sinalização ou promover interação entre células vizinhas (Vasta *et al.*, 2012). No ambiente intracelular, as Gals podem exercer funções biológicas que não envolvem a interação com glicanos, podendo regular a motilidade celular, a apoptose, o ciclo celular e o tráfego de vesículas e participar do *splicing* do pré-mRNA e da ativação de fatores de transcrição (Wu e Liu, 2018). A Gal-3 intracelular, por exemplo, faz associação com o centrossoma e corpos basais, e sua deleção faz com que haja desarranjo de microtúbulos e defeitos na morfologia do epitélio de cílios (Koch *et al.*, 2010). Já algumas das funções extra e intracelulares das Gals são opostas. A Gal-1 extracelular, por exemplo, é responsável por promover a proliferação de células cancerosas, mas intracelular desempenha um papel oposto na proliferação celular (Than *et al.*, 2015). A inibição da Gal-1 em modelo murino de câncer induzido pela inoculação subcutânea de células tumorais da glândula mamária (linhagem 4T1), mostrou uma redução no crescimento tumoral e na formação de metástases (Dalotto-Moreno *et al.*, 2013).

Na pele, as Gals foram detectadas em diferentes tipos celulares, sendo a Gal-1 expressa em queratinócitos, fibroblastos e LC (Akimoto *et al.*, 1995), a Gal-3 expressa em queratinócitos, fibroblastos, DCs e macrófagos (Larsen *et al.*, 2011), a Gal-7 é expressa em queratinócitos (Chen *et al.*, 2016) e a Gal-9 expressa em queratinócitos (Corrêa *et al.*, 2021). Diferentes Gals podem ter relação com a patogênese de diferentes doenças cutâneas como a DA, Ps, dermatite de contato alérgica, nas cicatrizações e também processos tumorais da pele (Wu e Liu, 2018). Pacientes com DA apresentam altos níveis de Gal-9 no sangue e na epiderme, que são maiores quanto mais severa a doença e diminuem após tratamento dos pacientes (Nakajima *et al.*, 2015). Além disso, a expressão da Gal-9 é relacionada com severidade da DA (Farag *et al.*, 2020). Em modelo experimental de DA, camundongos tratados com a Gal-1 recombinante tiveram melhora dos sinais clínicos e redução do

infiltrado inflamatório (Corrêa *et al.*, 2017).Já a Gal-9 exógena exerce papel anti-inflamatório na DA de contato experimental e na Ps, diminuindo os sinais inflamatórios e a produção de IFN-γ e IL-17, mas não de citocinas Th2 (Niwa *et al.*, 2009). Em biópsias de pele com e sem lesões de Ps, foi detectada baixa expressão do RNAm de Gal-1 e IL-10 em relação às peles sem a doença, enquanto o RNAm de Gal-3 diminuiu somente nas lesões e Gal-9 não mostrou alteração em nenhuma condição (De La Fuente *et al.*, 2012). Em pacientes com Ps, os níveis séricos de Gal-3 são diminuídos e após 3 meses de tratamento com luz UVB, há diminuição do escore PASI e restabelecimento dos níveis de Gal-3 sério (Khater *et al.*, 2020). Já pacientes com DA, há aumento da expressão da Gal-3 nas células inflamatórias da pele (Saegusa *et al.*, 2009).

Devido aos seus diversos papéis como sinais moduladores do comportamento de células imunológicas e à centralidade desses eventos de sinalização para vários processos normais e patológicos, há um interesse crescente nas Gals como alvos terapêuticos e a análise comparativa da expressão dessas proteínas em biópsias de pele com Ps e DA poderá auxiliar no diagnóstico diferencial de ambas as doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliamos o padrão de expressão das Gal-1, -3 e -9 e sua relação com as células inflamatórias na pele de pacientes com Ps e DA. Além disso, avaliamos *in vitro* os efeitos da administração destas Gals nos queratinócitos humanos (linhagem HaCaT) estimulados por TNF-α/IFN-γ, IL-4 ou IL-17.

2.2 Específicos

Nos estudos *in vivo,* avaliamos nas biopsias de pele com DA e Ps:

- A resposta inflamatória por meio da quantificação de mastócitos e de leucócitos;
- Padrão de expressão das Gal-1, -3 e -9 na epiderme e derme;
- Co-localização da expressão das Gal-1, -3 e -9 e células inflamatórias.

Nos estudos *in vitro* com os queratinócitos humanos, linhagem HaCaT, avaliamos:

- Viabilidade celular para os diferentes tratamentos/estímulos utilizados;
- Efeito das Gal-1, -3 e -9 sobre a produção de citocinas após estímulo com TNF-α/IFN-γ ou IL-17 ou IL-4;
- Efeito das Gal-1, -3 e -9 na proliferação e migração celular;

Nas análises por bioinformática dos transcriptomas publicamente disponíveis do repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO), avaliamos:

- Os níveis transcricionais das Gal-1, -3 e -9 utilizando estudos de peles de pacientes com DA e controles;
- Os níveis transcricionais das Gals utilizando estudos com queratinócitos humanos cultivados *in vitro* (HaCaT e células primárias) e com neutrófilos de pacientes com Ps.

3 CAPÍTULO 1 – Versão aceita do artigo: *The Role of Galectin-9 as Mediator of Atopic Dermatitis: Effect on Keratinocytes*

Revista – Cells
Doi: http://dx.doi.org/10.3390/cells10040947

Article

The Role of Galectin-9 as Mediator of Atopic Dermatitis: Effect on Keratinocytes

Mab P. Corrêa [1]; Libnah L. Areias [2]; Rebeca D. Correia-Silva [2]; Solange C. G. P. D'Ávila [3]; Andréia M. Leopoldino [4]; Karin V. Greco [5]; Cristiane D. Gil [1,2]*

[1] Programa de Pós-Graduação em Biociências, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil; mabiiic@gmail.com
[2] Departamento de Morfologia e Genética, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP 04023-900, Brazil; libnahleal@gmail.com (L.L.A.);
beca97c@gmail.com (R.D.C.-S.)
[3] Departamento de Patologia e Medicina Forense, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP 15090-000, Brazil; spdpatho@famerp.br
[4] Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil; andreiaml@usp.br
[5] Division of Surgery and Interventional Science, The Griffin Institute, University College London (UCL), London HA13UJ, UK; k.greco@ucl.ac.uk

* Correspondence: cristiane.gil@unifesp.br; Tel.: +55-11-5576-4268

Citation: Corrêa, M.P..; Areias, L.L.; Correia-Silva, R.D.; D´Ávila, S.C.G.P.; Leopoldino, A.M.; Greco, K.V.; Gil, C.D. The Role of Galectin-9 as Mediator of Atopic Dermatitis: Effect on Keratinocytes. *Cells* **2021**,

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Galectin-9 (Gal-9) is a beta-galactoside-binding protein with a variety of biological functions in immune response. However, in allergic diseases, its mechanism of action is not fully understood. This study evaluated the expression pattern of Gal-9 in patients with AD, in ovalbumin (OVA)-induced experimental atopic dermatitis (AD) in mice, as well as its effect on human keratinocytes. The skin of OVA-immunized BALB/c mice was challenged with drops containing OVA on days 11, 14-18, and 21-24. HaCaT cells were cultured in the following experimental conditions: control (growth medium only), stimulated with TNF-α/IFN-γ, IL-4, or IL-17 with or without Gal-9 treatment. AD was characterized by increased levels of Gal-9 in mouse and human skin, especially in the epidermis, and with a marked influx of Gal-9 positive eosinophils and mast cells compared to the control group. Gal-9 showed an immunomodulatory effect on keratinocytes by decreasing the release of IL-6 by IL-4-stimulated keratinocytes or increasing the IL-6 and RANTES levels by IL-17- or TNF-α/IFN-γ-stimulated cells, respectively. Under IL-17, Gal-9 treatment also altered the proliferation rate of cells. Overall, increased levels of Gal-9 in AD skin contribute to the control of inflammatory response and proliferative process of keratinocytes, suggesting this lectin as a relevant therapeutic target.

Keywords: Skin inflammation, Atopic Dermatitis, Galectin, Mast Cell, Eosinophil, Keratinocyte, IL-6.

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD), also known as atopic eczema, represents the most common inflammation of the skin, characterized by reddish lesions that itch, peel and sometimes get wet. AD has an early onset and can affect 25% of children and about 10% carrying the disease into adulthood (Leung and Guttman-Yassky 2014; Guttman-Yassky and Krueger 2017). AD patients have a higher incidence of bacterial, fungal or viral infections due to epithelial barrier dysfunction in skin lesions. AD etiology is not completely clear, and it seems to be multifactorial as there is evidence that genetic predisposition and family history of atopies can influence the onset of this disease. The barrier dysfunction occurs due to an impairment in keratinocytes terminal differentiation which permits antigens penetration. Furthermore, chronic pruritus and change in the pattern of resident microbiota support colonization by *Staphylococcus aureus* in the lesions (Leung and Guttman-Yassky 2014; Dainichi et al. 2018).

Complex immune responses that involve chronic skin inflammations show the challenge faced by doctors in the clinical diagnosis of these pathologies and the consequent application of appropriate treatment. The study of biomarkers, therefore, is paramount to better define the heterogeneity of these pathologies and contribute to the development of bespoke therapies. In this study, we focused on the galectin-9 (Gal-9), also known as ecalectin, tumor antigen HOM-HD-21 and urate transporter/channel protein. Gal-9 is a 40 kDa protein capable of regulating inflammatory response that belongs to a family of proteins that recognize β-galactosides in several cell surface receptors and extracellular matrix (ECM) receptors (Elola et al. 2018). In mammals, 15 members are described and classified in three subfamilies: (a) the prototypical galectins (1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, e 15), having a single type of carbohydrate recognition domain (CRD) displayed either as monomers or dimerizing to form homodimers with two CRDs; (b) tandem-repeats with repetitions in sequence (galectins 4, 6, 8, 9 and 12), that share two distinct and homologous CRDs and (c) the chimeric type, with Gal-3 as single member, formed of a collagen-like N-terminal domain and a C-terminal domain containing a single CRD (Elola et al. 2018; Liu and Rabinovich 2010).

It is shown that patients with AD have high levels of Gal-9 both in the serum and epidermis, with higher doses in the severe cases, which tends to decrease after treatment, suggesting proinflammatory action (Nakajima et al. 2015). Contrarily, in mouse experimental models, exogenous Gal-1 and Gal-9 play anti-inflammatory roles in both AD and allergic contact dermatitis (a Th1/Th17-profile disease) counteracting the inflammation and decreasing the production of IFN-γ and IL-17, but not of Th2 cytokines (Niwa et al. 2009; Cedeno-Laurent et al. 2010).

In relation to the mechanisms of action in allergy, Gal-9 seems to play a dual role, by either sometimes regulating or activating the cellular inflammatory response. Studies have shown that Gal-9 is able to bind to IgE and prevent the formation of the antigen-antibody complex and mast cell degranulation with consequent release of pro-inflammatory mediators (Niki et al. 2009). On the other hand, others have shown that incubation of human mast cells (HMC-1 strain) with Gal-9 was able to induce release of IL-6, IL-8 and MCP-1 via the activation of the ERK1/2 cascade (Kojima et al. 2014).

In *in vitro* chemotaxis assay, Gal-9 can act as a chemoattractive factor for human eosinophils (Sato et al. 2002). In human skin, IFN-γ provokes and enhanced expression of Gal-9 by the fibroblasts while the opposite effect is observed on keratinocytes (Igawa et al. 2006). The results suggest that a fibroblast-induced Gal-9 expression in dermis, would favour eosinophil chemotaxis in IFN-γ modulated type of inflammation.

Based on these paradoxical roles of Gal-9 in allergic reaction, especially in the skin, this study evaluates the expression of this lectin both *in vivo* using a murine AD model and *in vitro*, showing its role on keratinocytes under different inflammatory stimuli. We also assessed the expression of Gal-9 in biopsies from patients with confirmed clinical diagnosis of AD.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Model of Atopic Dermatitis

The mouse skin samples were obtained following our previous investigations (Corrêa et al. 2017) and approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of São

Paulo—UNIFESP (CEP 1906060115/2015). In summary, on days 0 and 7, male BALB/c mice were immunized with subcutaneous injection of 5 μg of ovalbumin (OVA; V grade; Sigma-Aldrich, EUA) and 10 mg/mL of the aluminum hydroxide adjuvant (ALUM; Sigma-Aldrich) diluted in 200 μl of sterile saline (Figure 1). On days 11, 14 to 18 and 21 to 24, dorsal shaved flanks of animals were challenged with 250 μg of OVA diluted in 50 μl of Johnson's Baby® oil. Sham animals received only sterile saline (days 0 and 7) and oil (days 11, 14-18, 21-24), while the naive group was only manipulated. After 24 h of the last OVA challenge, animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg, i.p.; Cetamin/Syntec) and xylazine hydrochloride (20 mg/kg; Xialazin/Syntec) and euthanized by cervical dislocation for skin collection.

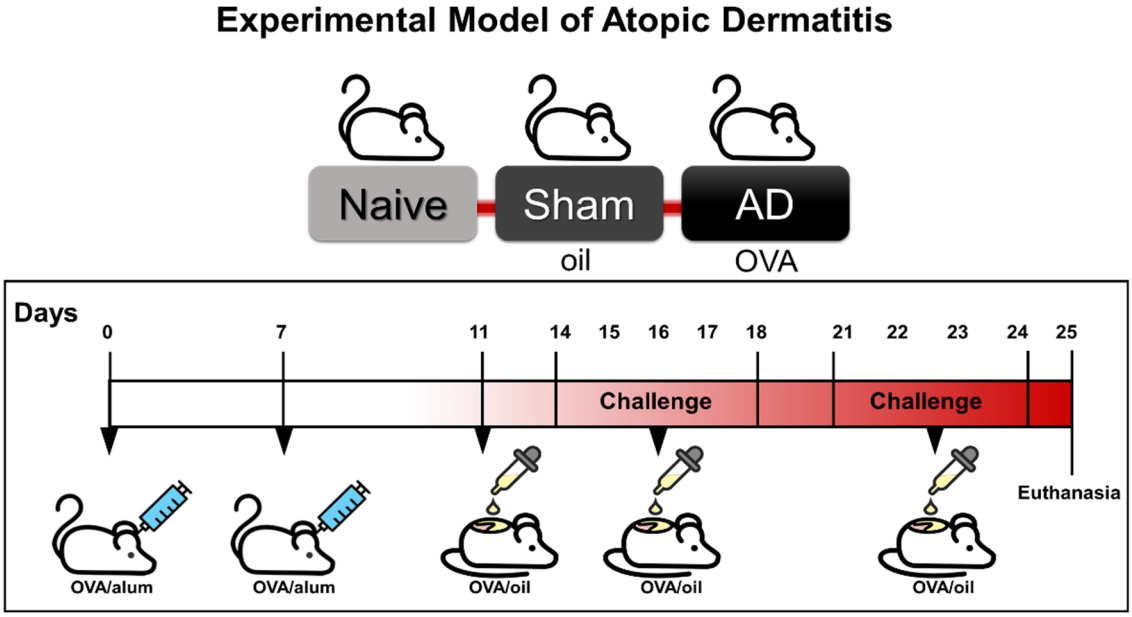


Figure 1. Experimental model of AD. On days 0 and 7, male BALB/c mice were immunized with subcutaneous injection of 5 μg of ovalbumin (OVA) and 10 mg/mL of the aluminum hydroxide adjuvant (alum). On days 11, 14 to 18 and 21 to 24, dorsal shaved flanks of animals were challenged with 250 μg of OVA diluted in 50 μl of Johnson's Baby® oil. Sham animals received only sterile saline (days 0 and 7) and oil (days 11, 14-18, 21-24), while the naive group was only manipulated. After 24 h of the last OVA challenge, animals were euthanized for skin analysis.

2.2. Histological analysis and quantification of mast cells in skin

Skins were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours and processed to paraffin embedding. Skin sections (3 μm) were stained by Diff-Quick (Laborclin, Brazil), a rapid hematology stain which is also based on the Romanowsky technique. For quantification of mast cells, intact cells were characterized by metachromatic cytoplasmic granules, while degranulated cells by the exocytosis of granules in the dermis. Cells were quantified in 10 fields per section, using a 40x objective on an Axio Scope A1 Zeiss microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Areas of each tissue were obtained using Axiovision software 4.8 (Carl Zeiss). Values are shown as mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of the number of cells per mm^2.

2.3. Human skin biopsies

Paraffin-embedded human skin biopsies (n = 9), with confirmed AD clinical diagnosis and anatomopathological analysis, were provided by the Department of Pathology and Forensic Medicine, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), Brazil. For control group, biopsies of clinically normal skin were used (n = 10). The study was approved by the Ethics Committee in Research of Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (CEP 2.225.518/2017), Brazil.

2.4. Galectin-9 levels: Immunohistochemistry and Western blotting

Immunohistochemistry and western blot analysis were performed as described previously (Corrêa et al. 2017). Briefly, for Gal-9 immunostaining, 3 μm-thick sections of mouse and human skins were incubated with polyclonal rabbit antibody anti-Gal-9 (Cusabio, Maryland, MD, USA), diluted 1:4000 (mouse skin) or 1:200 (human skin) in PBS 1% bovine serum albumin (BSA), for 16-18 hours, at 4ºC. After washing, sections were incubated with a secondary biotinylated antibody (LAB-SA Detection kit, Invitrogen, Paisley, UK). Positive staining was detected using a peroxidase-conjugated streptavidin complex, and color was developed using DAB substrate (Invitrogen). The sections were counterstained with hematoxylin. Densitometry analysis of Gal-9 immunostaining was performed in the epidermis and dermis (n = 5 animals/group or 9-10 patients/group). The values were obtained as arbitrary units (a.u.) between 0 and 255 using AxioVision software on an Axioskop 2 mot plus Zeiss microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The data are expressed as the mean ± SEM of a.u.

For western blotting, pooled protein extracts (30 μg per lane) of mouse skin (n = 3 animals per group) from indicated experimental conditions were loaded onto a 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel for electrophoresis together with appropriate molecular weight markers (Bio-Rad Life Science, USA) and transferred to ECL Hybond nitrocellulose membranes. Membranes were incubated for 15 minutes in 5% BSA in Tris-buffered saline (TBS) prior to incubation with rabbit polyclonal anti-Gal-9 (1:200) and anti-β-actin (1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), all diluted in TBS with 0.1% Tween 20. Post primary antibody incubation, membranes were washed with TBS and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000) (Thermo Fisher Scientific Inc., MI, USA). Immunoreactive proteins were detected (Westar Nova 2.0 chemiluminescent substrate kit; Cyanagen, Bologna, Italy) using a GeneGnome5 chemiluminescence detection system (SynGene, Cambridge, UK).

2.5. Immunofluorescence

Co-localization of Gal-9 and specific markers for mast cells and eosinophils in mouse skin was performed through incubation of sections with polyclonal antibody goat anti-mMCP6 (mouse mast cell protease 6; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) or anti-EPX (eosinophil peroxidase; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA), diluted 1:300 in PBS 1% BSA, for 16-18 hours, at 4°C. Sections were washed in PBS, and incubated for 1 hour at room temperature with rabbit anti-goat Ab conjugated with phycoerythrin (PE), 1:200 (Merck millipore, Burlington, MA, USA). After washing in PBS, sections were incubated in PBS 4% BSA 3% glycine for 1 h and, with rabbit anti-Gal-9 Ab (1:1000; Cusabio) for 4 h, at room temperature. Sections were washed in PBS, incubated with goat anti-rabbit Ab conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), 1:300 (Merck Millipore). Sections were mounted with fluoroshield ™ containing DAPI (Sigma-Aldrich) and analyzed on a Nikon Eclipse Ci-S fluorescence microscope (Tokyo, Japan).

2.6. Human keratinocyte culture and treatments

Human normal immortalized keratinocytes (HaCaT, CLS – Cell Line Service 300493), were grown in modified Dulbecco Eagle medium (DMEM) high glucose (4.5 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) with 4mM L-glutamine and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Br), 1 mM sodium pyruvate (Gibco), 0.1 mg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin (Invitrogen, UK). Upon reaching 80% confluence, cells were trypsinized, centrifuged and resuspended with 2 mL of medium. Cells were counted and the viability was tested using Trypan blue, before plating for different tests. $1x10^4$ cells/well were cultured in 96-well plates with 200 μL of DMEM + 10% FBS and incubated at 37°C under a humid atmosphere with 5% CO2. After reaching 80% confluence (~48h), cells were submitted to following experimental conditions: control (growth media) or stimulated with TNF-α/IFN-γ (10 ng/mL), IL-4 or IL-17 (100 ng/mL), according to previous studies [12-14]. After 15 minutes, part of cytokine-stimulated cells received human recombinant Gal-9 (Cusabio, Maryland, MD, USA) at 100 or 500 ng/mL. Recombinant human TNF-α, IFN-γ, IL-4 and IL-17 were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA).

2.7. Proinflammatory cytokine and RANTES/CCL5 levels

Keratinocytes were cultured in a 96-well plate at concentration of $1x10^4$ cells/well. After 24 h under different experimental conditions, IL-6, IL-8 and RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted; also known as CCL5) levels were detected in the cell supernatants using a commercially available ELISA kits (BD Biosciences, San Diego, CA, USA for IL-6 and IL-8; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA for RANTES) and according to the manufacturer's instructions. Values are shown as mean ± S.E.M. of the protein (pg/mL).

2.8. Cell proliferation assay

The proliferation of keratinocytes was detected by the 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were cultured in 96-well plates at concentration of $1x10^4$ cells/well. After 24, 48 and 72 hours, the supernatant was collected to add culture medium with 10% MTT (10 μL/well) in each well, and as negative control, 10% MTT solution was added in well without cells. The samples were incubated for 4 hours at 37°C. For solubilization of formazan crystals, 50 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) were added to each well and incubated for 10 min at 37ºC. The cell proliferation rate was calculated from optical density (OD540) values measured using the microplate reader ELISA EXL800 spectrophotometer (BioTek Instruments, Korea). The data was presented as a percentage of the control (n = 3/group in 2 independent experiments).

2.9. Scratch-wound assay

$3x10^4$ cells were seeded in 24 well-plate and grown to sub-confluency in growth media. A p200 pipet tip was used to scrape the cell monolayer in a straight line. Cells were washed twice with PBS to remove the debris. Immediately, cells were treated either with growth media (control), TNF-α/IFN-γ (10 ng/mL), IL-4 or IL-17 (100 ng/mL), with or without treatment with Gal-9 (100 or 500 ng/mL). Wound assays were observed after 6 to 48 h. The percentage decrease in the wound gaps was calculated using the Axiovision software (ZEISS) and normalized to the time 0 h wounds. To calculate the difference of initial wound gaps, the wound closure of control group was set up as 100% and the wound closures of other groups were calculated as relative percentages compared to control group.

2.10. Bioinformatic analysis

Four studies containing publicly available transcriptome data were selected from the Gene Expression Omnibus repository (GEOR): GSE120721 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi) – skins from healthy (control), lesion and non-lesion AD patients; GSE27533 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi) - control and IL-17A-stimulated HaCaT cells for 12 hours; GSE36287 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi) - primary keratinocytes from three donors (subjects 1, 2, and 3) were either untreated (control) or exposed to cytokines (IL-4, IL-13, IL-17A, IFN-alpha, IFN-gamma and TNF); GSE130588 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi) – control (healthy patients), lesion and non-lesion skins from AD patients treated weekly with subcutaneous doses of 200 mg of dupilumab for 16 weeks. Datasets were individually analyzed using the license-free algorithms implemented in the GEO2R tool (available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/) that allows users to compare different groups of samples in a GEO series to examine differentially expressed genes according to experimental conditions. GEO2R was applied to detect Gal-9 gene (*LGALS9*) between different experimental conditions. The p values of gene expression after Log2 transformation were used to calculate the Z-score (individual value - population average/population standard deviation).

2.11. Statistical analysis

The data were analyzed using the GraphPad software version 9.00. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of the data. The data of the experimental groups were compared by means of analysis of variance (ANOVA One-way), followed by the application of the Kruskal-Wallis

test for non-parametric samples or the Bonferroni test for parametric ones. For transcriptome data, student t-test was applied when comparing two groups. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Gal-9 levels are upregulated in murine and human AD

As previously described by Corrêa et al (Corrêa et al. 2017), 24 hours after the last OVA challenge, the skins of the mice showed epidermal hyperplasia patches and intense influx of inflammatory cells in the dermis, especially eosinophils and mast cells, when compared to the control groups (naive and sham) (Figure 2a-b). In the AD group, several mast cells showed a weaker staining, suggesting greater cell activation with consequent release of mediators from cytoplasmic granules comparatively to the control condition (Figures 2a1, b1). The quantification of intact and degranulated mast cells in the dermis confirmed the histological observations. AD skin samples showed a significant increase in degranulated mast cells compared to controls, while the number of intact cells was similar between the different experimental groups (Figure 2 c). AD skin samples were stained for specific mast cell and eosinophil mediator markers, mMCP6 and EPX, respectively. Results showed that these two cell types represent potential sources of Gal-9, as demonstrated by the co-localization of these markers in the cytoplasm by immunofluorescence (Figure 2d).

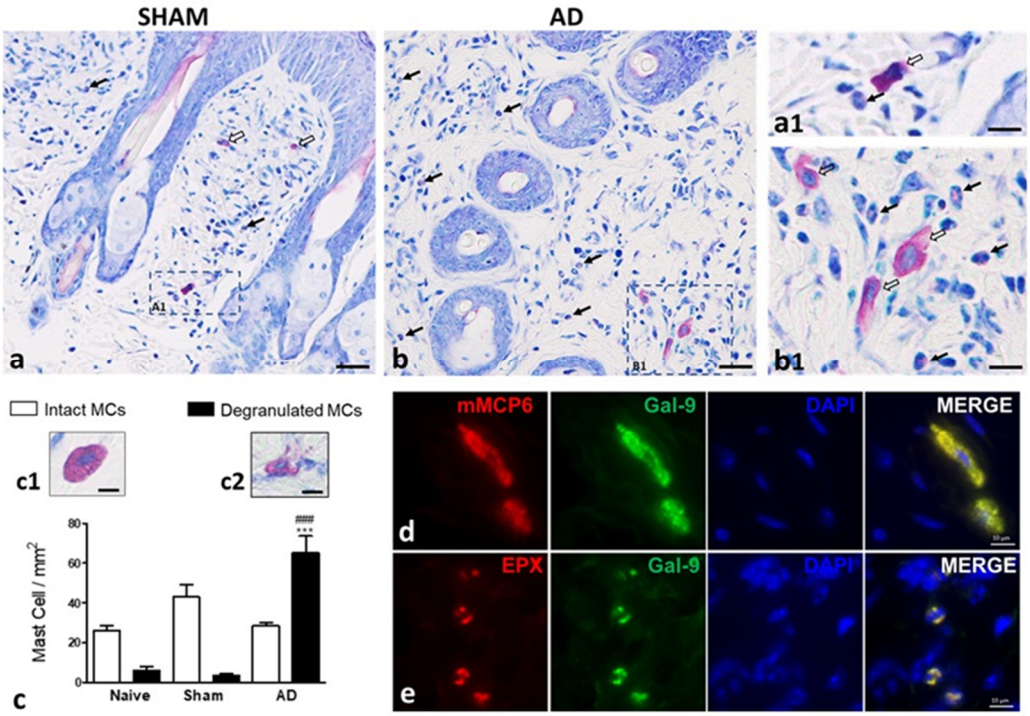


Figure 2. Inflammatory response in the skin. Intense influx of eosinophils (black arrows; **b** and **b1**) and activated mast cells (white arrows; **b1**) were observed in the dermis of AD group (**b**) in comparison to the SHAM (**a**). Mast cells in **b1** showed a weaker staining compared to the cell in figure **a1** related to their greater activation with the release of cytoplasmic granules. Stain: Diff-Quick. (**c**) Quantification of intact (IMCs) and degranulated mast cells (DMCs) in the dermis. IMCs were characterized by metachromatic cytoplasmic granules, while DMCs by the exocytosis of granules in the dermis. Data represent mean ± S.E.M. of the number of cells per mm^2 (n= 5 animals/group). ***P < 0.001 *vs* Naïve/Degranulated MCs; ###P < 0.001 *vs* Sham/Degranulated MCs (ANOVA, Bonferroni post-test). (**d, e**) Immunofluorescence double staining for mouse mast cell protease 6 (mMCP6) or eosinophil peroxidase (EPX) and Gal-9 in AD skin. mMCP6 and EPX are co-localized with Gal-9 in the cytosol of mast cells (**d**) and eosinophils (**e**). DAPI was used as nuclear counterstain. Scale bars: 25 μm (**a, b**); 10 μm (**a1, b1, d, e**); 5 μm (**c1, c2**).

In addition, Gal-9 expression was detected in the epidermis and dermis in all experimental conditions, showing the epithelium as a potential source of this lectin (Figures 3 a-c). AD was associated with intense immunoreactivity for Gal-9 in the epidermis and dermis compared to the Naive and SHAM control groups (Figures 3a-c). No immunostaining was detected in the samples used to control the reaction (Figure 3d). These observations were confirmed by densitometric analysis, showing a significant increase in the levels of Gal-9 in the epidermis and dermis of the AD group compared to the controls (Figures 3 e-f). Results from skin immunoblots corroborated with these findings, showing strong immunoreactivity for Gal-9 levels in AD skin (Figure 3g).

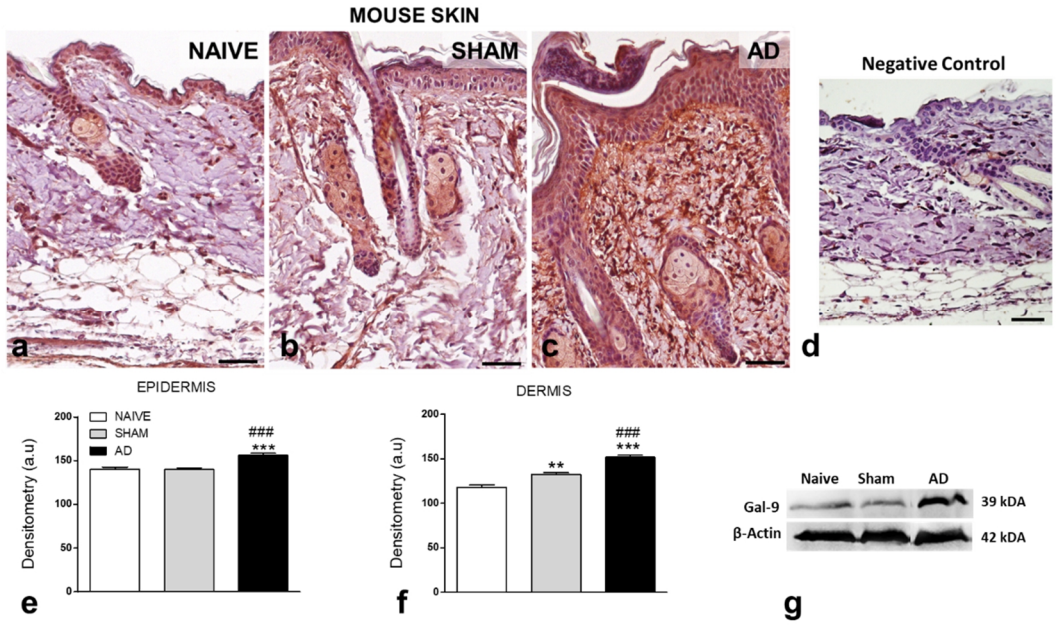


Figure 3. Expression of Gal-9 in the mouse skin. (**a-c**) Intense immunoreactivity for Gal-9 in the mouse epidermis and dermis detected in the AD group compared to controls (Naïve and Sham groups). (**d**) Negative control shows absence of immunoreactivity for Gal-9. Counterstain: Hematoxylin. Scale bars: 40 μm. (**e, f**) Densitometric analysis of Gal-9 expression in mouse epidermis and dermis. Data represent means ± S.E.M. of Gal-9 expression in arbitrary units (u.a.) (n = 5 animals/group). **P < 0.01, ***P < 0.001 *vs* Naive; ###P < 0.001 *vs* Sham (Kruskal-Wallis, Dunn post-test). (**g**) Western blot analysis to measure Gal-9 levels in the mouse skins. β-Actin was used as a protein loading control (data represent one illustrative blot from two independent experiments).

Expression of Gal-9 in human skin biopsies were analyzed in both control and AD patient samples. The analyzes showed an increase in the expression of Gal-9 in the epidermis of AD skins compared to control (Figures 4a, b). Negative control did not show immunopositivity for Gal-9, confirming the specificity of the primary antibody (Figure 4c). Densitometric scores confirmed the histological observations, showing an increase in the expression of Gal-9 in AD samples, especially in the cytoplasm of the keratinocytes (Figure 4d). Transcriptome analyses from GSE120721 study also show increased levels of Gal-9 mRNA in lesion AD skins compared with non lesion AD and control (healthy) skins (Figure 4e). Additionally, transcriptome analyses of HaCaT cells demonstrated decreased transcriptional levels of *LGALS9* gene under IL-17A stimulation compared to the control cells (Figure 4f). A similar pattern of *LGALS9* expression was detected in the primary keratinocytes under IL-17A stimulation, however, under other inflammatory stimuli, *LGALS9* expression pattern changes completely (Figure 4g).

Interestingly, mRNA transcriptomics from GSE130588 study showed that treatment with dupilumab, an efficient biologic therapy for AD treatment that inhibits signaling of both IL-4 and IL-13 (Beck et al. 2014; Zhou et al. 2021), downregulated the transcriptional levels of *LGALS9* gene in the lesion skins from AD patients compared to control skins (Figure 4h). Non-lesion AD skins also showed decreased levels of *LGALS9* in the weeks 0 and 16 of drug treatment compared to control skins (Figure 4h).

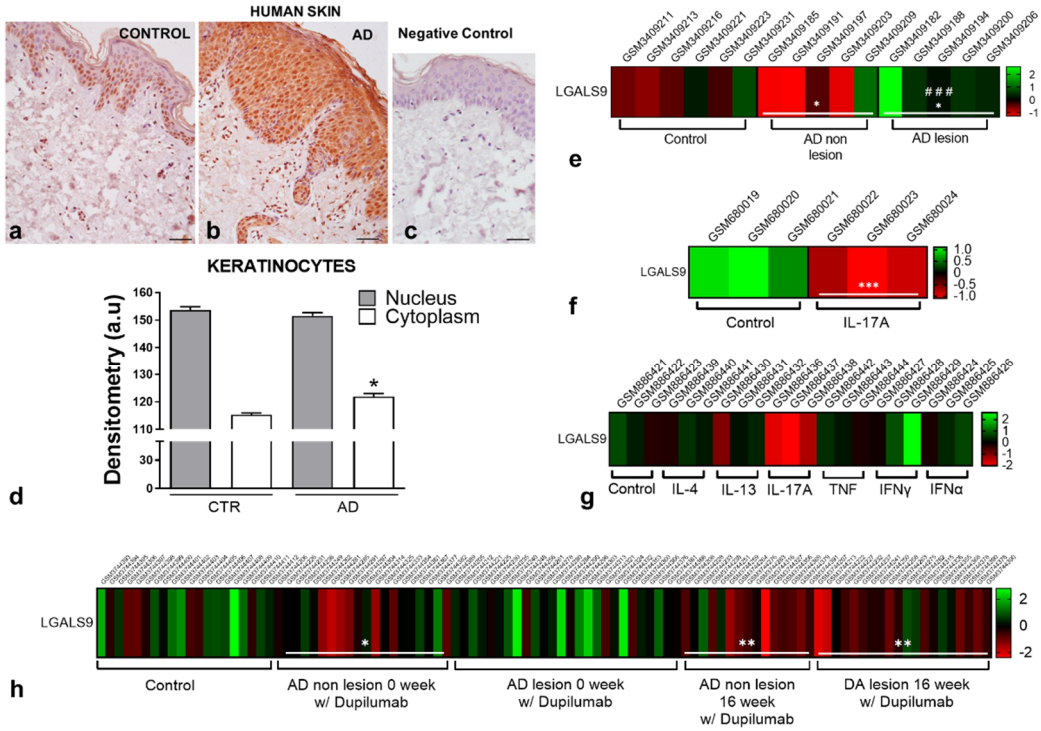


Figure 4. Expression of Gal-9 in the human skin. (**a, b**) Levels of Gal-9 in the human AD and control skins. Epidermis from AD skin samples shows intense immunoreactivity for Gal-9 compared to the control skin. (**c**) Absence of immunoreactivity for Gal-9 in the negative control. Counterstain: Hematoxilin. Scale bars: 40 μm. (**d**) Densitometry for Gal-9 in keratinocytes. Data represent means ± S.E.M. of Gal-9 expression in the nucleus and cytoplasm of cells in a.u. (n = 9-10 patients/group). *P < 0.05 *vs* cytoplasm of control keratinocyte (Kruskal-Wallis, Dunn post-test). (**e-h**) Heatmaps based on the Z-scores of *LGALS9* transcriptional levels in the healthy (control) and AD human skins (GSE120721); control/IL-17A-stimulated HaCaT cells (GSE27533); control and cytokine (IL-4, IL-13, IL-17A, IFN-γ, IFN-α and TNF)-stimulated primary keratinocytes (GSE36287); and in the control (healthy patients), lesion and non-lesion skins from AD patients treated weekly with subcutaneous doses of 200 mg of dupilumab for 16 weeks (GSE130588). * P < 0.05, ** P < 0.01 *vs* Control (healthy skins); ###P < 0.0001 *vs* AD non-lesion (ANOVA, Bonferroni post-test). ***P < 0.001 *vs* control HaCaT cells (t-test, unpaired).

3.2. Effect of exogenous administration of Gal-9 on keratinocytes: cytokine release, proliferation and migration rates

Once it was found that the levels of Gal-9 mRNA and protein are increased in AD and after treatment with dupilumab they are reduced, our next step was to evaluate the effect of exogenous administration of Gal-9 on keratinocytes under different cytokine stimulation. After 24 hours of TNF-α/IFN-γ stimulation, keratinocytes significantly increase the IL-6 and IL-8 production compared to the control cells (Figures 5a, b), and no effect of Gal-9 treatment was observed for both cytokines under TNF-α/IFN-γ stimulation. Curiously, TNF-α/IFN-γ-stimulated keratinocytes plus Gal-9 treatment (100 and 500 ng/mL) produced a marked release of RANTES compared to control cells (Figure 5c). Under IL-4 stimulation, Gal-9 at 100 and 500 ng/mL significantly decrease the IL-6 release (Figure 5d). On the other hand, IL-17-stimulated keratinocytes plus Gal-9 treatment (500 ng/mL) produced a marked release of IL-6 compared to control cells (Figure 5g). No alterations were detected in the IL-8 and RANTES release by the IL-4 or IL-17-stimulated keratinocytes (Figures 5 e, f, h, i).

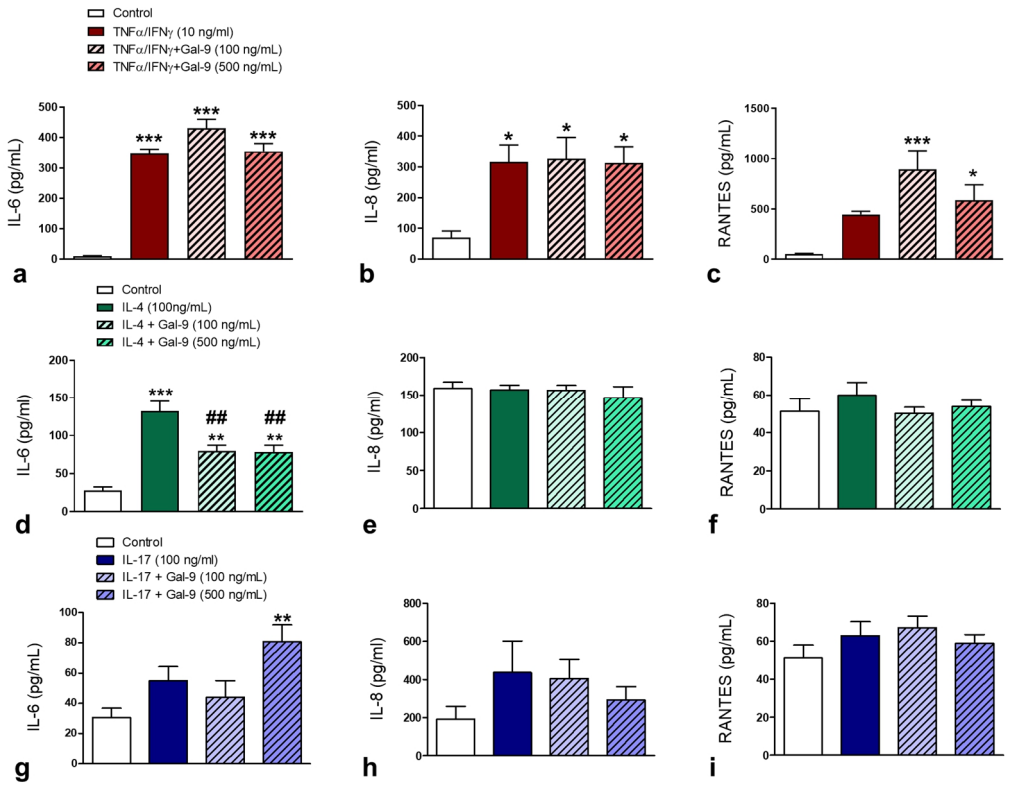


Figure 5. Effect of Gal-9 on cytokine release by keratinocytes. Human keratinocytes were submitted to the following experimental conditions: control (growth media), stimulated with TNF-α/IFN-γ (10 ng/mL; **a**) or IL-4 (100 ng/mL; **d**) or IL-17 (100 ng/mL; **g**), and after 15 minutes they received human recombinant Gal-9 at 100 or 500 ng/mL or media (control). After 24 hours, ELISA was performed to determine cytokine release. (**a, d, g**) IL-6 levels. (**b, e, h**) IL-8 levels. (**c, f, i**) RANTES levels (n = 3/group in 2 independent experiments). Data are presented as the mean ± SEM of cytokine levels (pg/mL). *P < 0.05; ***P < 0.001 *vs*. Control; #P < 0.05; ##P < 0.01 *vs*. at corresponding cytokine stimulation without Gal-9 (ANOVA, Bonferroni post hoc test).

The next step was to evaluate the effect of the Gal-9 on the keratinocyte proliferation rate. No effect of this lectin treatment was detected under TNF-α/IFN-γ and IL-4 stimulation. TNF-α/IFN-γ (with or without 100 or 500 ng/mL of Gal-9) produced a marked decrease of the keratinocyte proliferation rate, especially at 48 and 72 hours, in comparison to control cells (Figure 6a). Under IL-4 stimulation (with or without Gal-9) increased proliferation rate was detected for keratinocytes at 72h (Figure 6b). On the other hand, both concentrations of Gal-9 increased keratinocyte proliferation at 24h compared to the untreated IL-17-stimulated cells (Figure 6c). At 48 and 72h, the lowest concentration of Gal-9 abrogated the effect of IL-17 stimulation on keratinocytes and produced similar proliferative rate of control cells (Figure 6c).

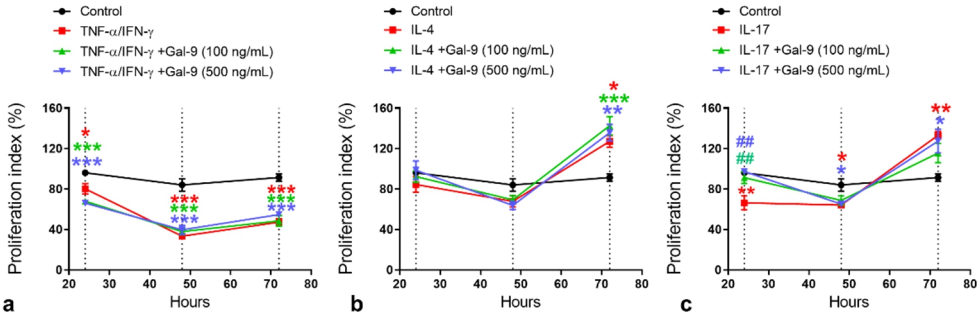


Figure 6. Effect of Gal-9 on HaCaT proliferation rate. Human keratinocytes were submitted to the following experimental conditions: control (growth media), stimulated with TNF-α/IFN-γ (10 ng/mL;

a) or IL-4 (100 ng/mL; **b**) or IL-17 (100 ng/mL; **c**), and after 15 minutes they received human recombinant Gal-9 at 100 or 500 ng/mL or media. After 24, 48 and 72 hours, MTT assay was performed to determine proliferation rate (% of control; data represent mean ± S.E.M.) (n = 3/group in 2 independent experiments). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 *vs*. Control; ##P < 0.01 *vs*. IL-17-stimulated cells (ANOVA, Bonferroni post-test).

We also verified the effect of Gal-9 on cell migration using the scratch-wound assay (Figure 7). TNF-α/IFN-γ stimulation, with or without Gal-9 treatment, significantly reduced the rate of keratinocyte migration compared to the control (Figures 7a, b), while no differences were detected under IL-4 and IL-17 stimulation alone or with Gal-9 treatment (Figures 7 c-f).

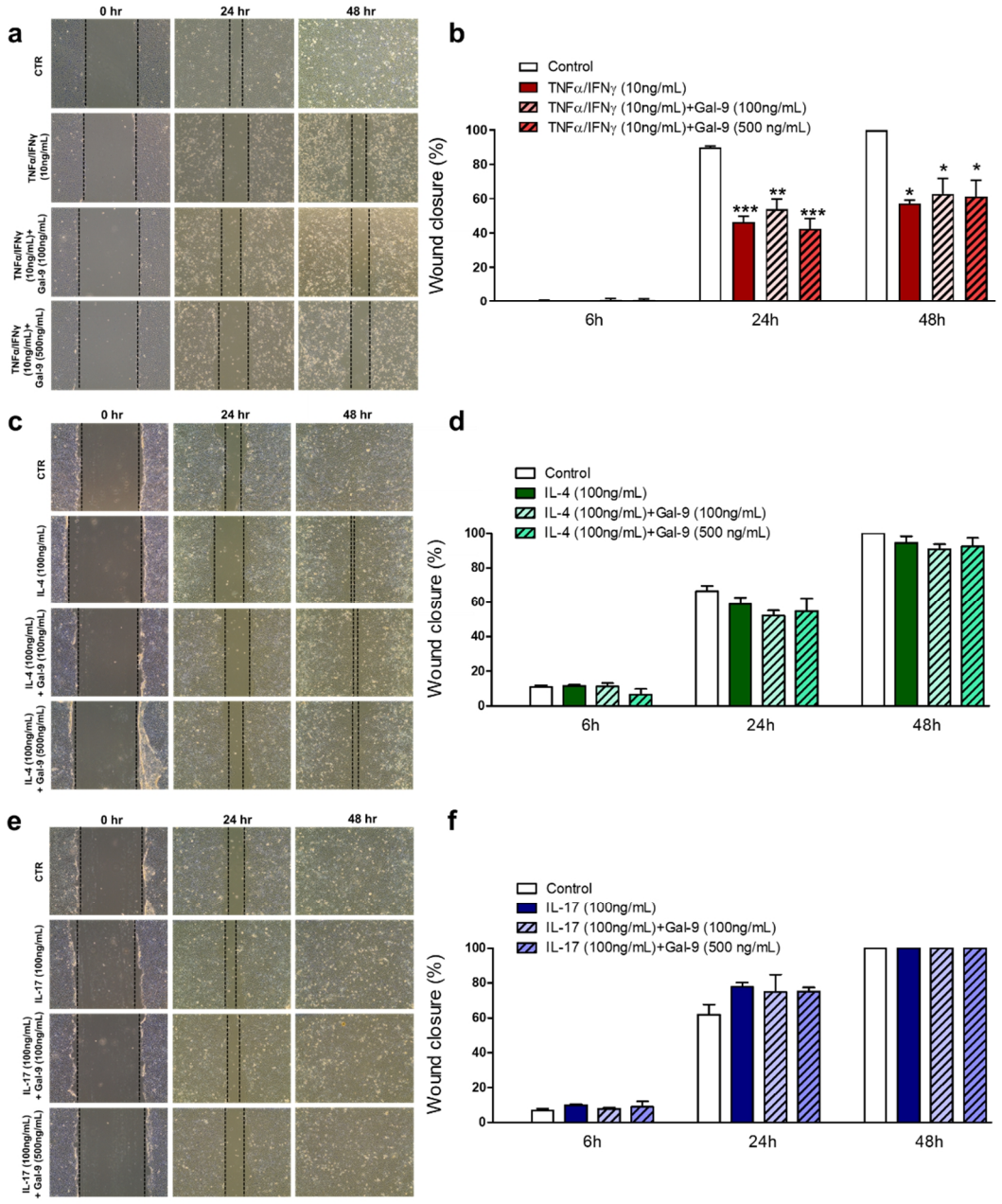


Figure 7. Scratch assay: assessment of HaCaT migration rate after cytokine stimulation and Gal-9 treatment. Human keratinocytes were submitted to the following experimental conditions: control (growth media), stimulated with TNF-α/IFN-γ (10 ng/mL), IL-4 (100 ng/mL) or IL-17 (100 ng/mL), and after 15 minutes they received human recombinant Gal-9 at 100 or 500 ng/mL or media. Wound assays were observed after 6, 24 and 48 h. Cells were seeded in complete media. Representative

photomicrographs show no effect of Gal-9 treatment on keratinocytes under TNF-α/IFN-γ (**a, b**), IL-4 (**c, d**) or IL-17 (**e, f**) stimulation compared to non-treated conditions (n = 3/group in 2 independent experiments). Data are presented as the mean ± SEM of wound closure (%). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 *vs*. control at the corresponding time point (ANOVA, Bonferroni post hoc test).

4. Discussion

Considering that the role of Gal-9 is not well established in allergic inflammation, in this study we evaluated the expression of this lectin in an experimental AD model in mice and human skin biopsies from patients with AD, as well as the effect of the administration of Gal-9 in human keratinocytes *in vitro.*

Histological analysis of the mice's skin revealed intense eosinophilia in the dermis, in addition to a high influx of degranulated mast cells in AD animals when compared to controls (Naive and Sham). These findings corroborate other studies using an experimental model of AD induced by OVA (Corrêa et al. 2017; Kim et al. 2012), mite (Matsuoka et al. 2003), dinitrochlorobenzene (Kim et al. 2014) and oxazolone (Heo et al. 2015), whose models mimic type I and IV hypersensitivity response. In addition, studies using a model of pollen-induced allergic conjunctivitis have demonstrated that mast cell-deficient mice, after been challenged with pollen in the conjunctival sac, had not shown clinical signs and conjunctival eosinophilia as prominent as in wild animals (Miyazaki et al. 2008; Fukuda et al. 2009). This effect was reversed when the deficient animals were repopulated with mast cells, showing that these cells have a prominent role in the initiation of the allergic response in conjunctivitis (clinical signs) and recruitment of eosinophils.

Inflammatory response observed in our murine model of AD was associated with high levels of Gal-9 when compared to the respective control groups. Interestingly, our results showed that mast cells and eosinophils are potential sources of Gal-9 in skin with AD. In fact, Gal-9 is expressed in human mast cell (HCM-1) and mouse (MC/9) cells lines that, upon stimulation, release this lectin to the external environment (Niki et al. 2009). Peripheral blood eosinophils from patients with hypereosinophilic diseases (eosinophilic pneumonia, bronchial asthma, angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia and hypereosinophilic syndrome) have strong immunoreactivity for Gal-9 in the plasma membrane and cytoplasm compared to non-atopic control cells (Saita et al. 2002). In experimental models of OVA- or mite-induced asthma in rodents, high levels of Gal-9 were detected in the lungs and bronchoalveolar fluid (BALF) 7 and 24 hours after the last challenge (Yamamoto et al. 2007; Sziksz et al. 2010; Katoh et al. 2013). An enhanced number of Gal-9-positive inflammatory cells in the BALF has also been detected in animals challenged with OVA (Sziksz et al. 2010).

In skin lesions of AD patients, we showed that Gal-9 is highly expressed in the epidermis in comparison with control skins, especially in the cytoplasm of keratinocytes, which is in line with previous studies (Nakajima et al. 2015; Farag et al. 2020). The gene expression profiling analysis from GSE120721 study showed increased levels of *LGALS9* in AD skin lesions compared with non-lesion AD and control (healthy) skins, which confirmed our immunohistochemistry findings. Furthermore, mRNA transcriptomics of Gal-9 from GSE130588 study showed that treatment with dupilumab for 16 weeks downregulated its transcriptional levels in the lesional skins from AD patients compared to control skins. In this study, the inhibition of IL-4/IL-13 signaling through dupilumab treatment significantly improved AD signs and symptoms and induced a progressive shift of AD molecular phenotype from lesional to non-lesional skin (Guttman-Yassky et al. 2019). Altogether, the studies confirm that the Th2-predominant inflammation induces a marked increase in the levels of Gal-9 mRNA and protein in the AD skins by keratinocytes (epidermis) and inflammatory cells (mast cells and eosinophils in the dermis), effect abrogated by the inhibition of IL-4/IL-13 signaling.

Prevention of allergic symptoms was related with the increased levels of Gal-9 in the intestinal epithelial cells induced by the ingestion of dietary probiotic mixture or sym-biotic (de Kivit et al. 2012; Kim et al. 2019). Using murine model for cow's milk allergy, the authors showed a reduction in acute hypersensitivity response associated with increased serum Gal-9 levels in allergic mice compared to the sham group (de Kivit et al. 2012). Additionally, incubation of Gal-9 with human peripheral blood mononuclear cells from healthy donors enhanced the percentage of Th1 and Treg cells dose dependently, resulting in increased secretion of IFN-γ and IL-10 and suppressed IL-17 production (de Kivit et al. 2012). It has been shown Gal-9-treated monocyte-derived human dendritic cells also

increased the secretion of Th1 cytokines (IFN, TNF and IL-2) from allogeneic CD4 T cells, whereas no effect was detected in the production of Th2 (IL-4 and IL-5) (Dai et al. 2005), which can contribute to the suppression of allergen-induced Th2-type responses.

In fact, intravenous, intranasal or sublingual administration of Gal-9 has been shown to be an important therapeutic tool in experimental models of asthma (Ikeda et al. 2017; Katoh et al. 2007; Katoh et al. 2013). In these studies, treatment with Gal-9 reduced hyperactivity of respiratory epithelial cells, hypersecretion of mucus, leukocyte infiltration into the lungs and BALF. It has also been shown that Gal-9 treatment reduced Th1 (TNF-α, IFN-γ) and Th2 (IL-5, IL-13) cytokine and chemokine (RANTES, IP-10, CCL11 and CCL17) production in BALF. On the other hand, i.p. or subconjunctival treatments of mice with anti-Gal-9 antibodies, do not affect the severity of pollen-induced allergic conjunctivitis, both in the induction and effector phases of the disease [39]. Overall, investigations demonstrate a potent anti-inflammatory role of Gal-9 in the responses induced by different allergens in the murine models of Th2-diseases and, when the protein is blocked, this effect is suppressed.

Regarding AD, epidermal barrier disruption and microbial invasion trigger the production of various keratinocyte-derived cytokines, such as IL-6, TNF-α and RANTES, which promote the recruitment of inflammatory cells to the skin and activation of T helper (Th) 17 cells, which plays an important part in the early stage of this disease (Chieosilapatham et al. 2021). Additionally, IL-17 stimulates Th2 cells to produce IL-4, contributing to the AD inflammation (Nakajima et al. 2014). Curiously, IL-17 production can contribute to the downregulation of Gal-9 in epidermis, as showed by the decreased levels of *LGALS9* in the IL-17A-stimulated human keratinocytes in the transcriptome analysis of GSE27533 and GSE36287 studies.

Considering that keratinocyte-derived cytokines are involved in the pathogenesis of AD (Asahina and Maeda 2017; Chieosilapatham et al. 2021), the next step was to evaluate the exogenous effect of Gal-9 in the human keratinocytes under mimetic AD microenvironment (TNF-α/IFN-γ, IL-4 or IL-17 stimulation). After 24 hours of inflammatory stimulation, keratinocytes showed an enhanced release of IL-6 and IL-8. The effect of Gal-9 on the release of cytokines by keratinocytes was antagonistic and dependent on the inflammatory stimulus involved. Under effect of TNF-α/IFN-γ, exogenous administration of Gal-9 induced the release of RANTES by keratinocytes which contributes to the recruitment of eosinophils in AD skin (Kameyoshi et al. 1992). Treatment with Gal-9 was also able to reverse the release of IL-6 in the IL-4-stimulated cells, but under IL-17 stimulation the higher concentration of Gal-9 produced greater release of IL-6 by keratinocytes. Considering that: i) Th2 cytokines can stimulate eosinophils to produce IL-12 and promote a switch from a Th2-like immune response, in acute lesions, to a Th1-like immune response, in chronic lesions of AD (Liu, Goodarzi, and Chen 2011; Grewe et al. 1998); and ii) IL-6 contributes to the transition from acute to chronic phase of AD through induction of Th2 differentiation and inhibition of Th1 polarization (Diehl and Rincón 2002); our findings show a potent immunomodulatory effect of Gal-9 on keratinocytes under inflammatory microenvironment of AD.

Finally, under IL-17 stimulation, we showed that exogenous Gal-9 at both concentrations (100 and 500 ng/mL) increased keratinocyte proliferation rate at 24h, an effect that was abrogated in a dependent concentration manner. However, no effect of Gal-9 treatment on the keratinocyte proliferation and migration rates under IL-4 and TNF-α/IFN-γ stimulation. Despite this, studies have shown that IFN-γ suppressed mRNA expression of Gal-9 in epidermal keratinocytes, as well as reduced surface Gal-9 expression in a dose dependent manner (Igawa et al. 2006). Furthermore, transfection of Gal-9 cDNA into oral squamous carcinoma Ca9-22 cells produced a marked increase in the cellular adhesion to fibronectin and collagen I compared to non-transfected cells (Kasamatsu et al. 2005).

Altogether, these findings suggest that exogenous Gal-9 exerts an immunomodulatory effect on keratinocytes and contributes to epidermal homeostasis through regulation of cell adhesion and proliferation against increased epidermal proliferation and disturbed differentiation provoked by AD-induced inflammatory microenvironment. However, this study has some limitations and more detailed investigations are warranted in the future to evaluate the effect of Gal-9 administration in the IL-13 and IL-22-stimulated keratinocytes, two important cytokines that regulates cellular responses in AD pathogenesis (Brunner, Guttman-Yassky, and Leung 2017).

5. Conclusions

In conclusion, our results showed that increased levels of Gal-9 in the pathogenesis of AD represent an important step for the counter-regulation of the skin inflammatory response and epidermis proliferation.

Author Contributions: Conceptualization: M.P.C., C.D.G.; methodology: M.P.C., L.L.A., R.D.C.-S., S.C.G.P.D., A.M.L., K.V.G.; formal analysis and investigation: M.P.C., L.L.A.; writing—original draft preparation: M.P.C., C.D.G.; writing—review and editing: K.V.G.; funding acquisition: C.D.G.; resources: A.M.L., K.V.G., C.D.G.; supervision: C.D.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant number 2017/26872-5 (CDG). MPC and LLA were supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Finance Code 001) and FAPESP scholarships (2017/10610-1), respectively.

Institutional Review Board Statement: The mouse experimental model was conducted according to the Brazilian Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 06/04/2015 (protocol code 1906060115). The study with human skin biopsies and cell line was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of FAMERP in the meeting of 17/08/2017 (protocol code 2.225.518).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available on request due to restrictions.

Acknowledgments: The authors thank Mr. Paulo Celso Franco from the Department of Morphology and Genetics, UNIFESP, for his skillful technical assistance.

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

References

1. Leung, D.Y.; Guttman-Yassky, E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: Shifting paradigms in treatment approaches. *J Allergy Clin Immunol* **2014**, *134*, 769-779, doi:10.1016/j.jaci.2014.08.008.
2. Guttman-Yassky, E.; Krueger, J.G. Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? *Curr Opin Immunol* **2017**, *48*, 68-73, doi:10.1016/j.coi.2017.08.008.
3. Dainichi, T.; Kitoh, A.; Otsuka, A.; Nakajima, S.; Nomura, T.; Kaplan, D.H.; Kabashima, K. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol* **2018**, *19*, 1286-1298, doi:10.1038/s41590-018-0256-2.
4. Elola, M.T.; Ferragut, F.; Méndez-Huergo, S.P.; Croci, D.O.; Bracalente, C.; Rabinovich, G.A. Galectins: Multitask signaling molecules linking fibroblast, endothelial and immune cell programs in the tumor microenvironment. *Cell Immunol* **2018**, *333*, 34-45, doi:10.1016/j.cellimm.2018.03.008.
5. Liu, F.T.; Rabinovich, G.A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **2010**, *1183*, 158-182, doi:NYAS5131 [pii]10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x.
6. Nakajima, R.; Miyagaki, T.; Oka, T.; Nakao, M.; Kawaguchi, M.; Suga, H.; Morimura, S.; Kai, H.; Asano, Y.; Tada, Y.; et al. Elevated serum galectin-9 levels in patients with atopic dermatitis. J *Dermatol 2***015,** 42, 723-726, doi:10.1111/1346-8138.12884.
7. Niwa, H.; Satoh, T.; Matsushima, Y.; Hosoya, K.; Saeki, K.; Niki, T.; Hirashima, M.; Yokozeki, H. Stable form of galectin-9, a Tim-3 ligand, inhibits contact hypersensitivity and psoriatic

reactions: a potent therapeutic tool for Th1- and/or Th17-mediated skin inflammation. C*lin Immunol* 2**009,** 1*32,* 184-194, doi:10.1016/j.clim.2009.04.012.

8. Cedeno-Laurent, F.; Barthel, S.R.; Opperman, M.J.; Lee, D.M.; Clark, R.A.; Dimitroff, C.J. Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation. J *Immunol* 2**010,** 1*85,* 4659-4672, doi:10.4049/jimmunol.1000715.
9. Niki, T.; Tsutsui, S.; Hirose, S.; Aradono, S.; Sugimoto, Y.; Takeshita, K.; Nishi, N.; Hirashima, M. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. J *Biol Chem* 2**009,** 2*84,* 32344-32352, doi:10.1074/jbc.M109.035196.
10. Kojima, R.; Ohno, T.; Iikura, M.; Niki, T.; Hirashima, M.; Iwaya, K.; Tsuda, H.; Nonoyama, S.; Matsuda, A.; Saito, H.; et al. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. P*LoS One* 2**014,** 9, e86106, doi:10.1371/journal.pone.0086106.
11. Sato, M.; Nishi, N.; Shoji, H.; Seki, M.; Hashidate, T.; Hirabayashi, J.; Kasai Ki, K.; Hata, Y.; Suzuki, S.; Hirashima, M.; et al. Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. G*lycobiology* 2**002,** 12, 191-197, doi:10.1093/glycob/12.3.191.
12. Igawa, K.; Satoh, T.; Hirashima, M.; Yokozeki, H. Regulatory mechanisms of galectin-9 and eotaxin-3 synthesis in epidermal keratinocytes: possible involvement of galectin-9 in dermal eosinophilia of Th1-polarized skin inflammation. A*llergy* 2**006,** 6*1,* 1385-1391, doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01130.x.
13. Corrêa, M.P.; Andrade, F.E.C.; Gimenes, A.D.; Gil, C.D. Anti-inflammatory effect of galectin-1 in a murine model of atopic dermatitis. J *Mol Med (Berl)* 2**017,** doi:10.1007/s00109-017-1566-9.
14. Beck, L.A.; Thaçi, D.; Hamilton, J.D.; Graham, N.M.; Bieber, T.; Rocklin, R.; Ming, J.E.; Ren, H.; Kao, R.; Simpson, E.; et al. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. N *Engl J Med* 2**014,** 3*71,* 130-139, doi:10.1056/NEJMoa1314768.
15. Zhou, S.; Qi, F.; Gong, Y.; Zhang, J.; Zhu, B. Biological Therapies for Atopic Dermatitis: A Systematic Review. D*ermatology* 2**021,** 1-11, doi:10.1159/000514535.
16. Kim, H.J.; Kim, Y.J.; Kang, M.J.; Seo, J.H.; Kim, H.Y.; Jeong, S.K.; Lee, S.H.; Kim, J.M.; Hong, S.J. A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of Lactobacillus rhamnosus. E*xp Dermatol* 2**012,** 2*1,* 672-675, doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01539.x.
17. Matsuoka, H.; Maki, N.; Yoshida, S.; Arai, M.; Wang, J.; Oikawa, Y.; Ikeda, T.; Hirota, N.; Nakagawa, H.; Ishii, A. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite Dermatophagoides farinae. A*llergy* 2**003,** 5*8,* 139-145.
18. Kim, H.; Kim, J.R.; Kang, H.; Choi, J.; Yang, H.; Lee, P.; Kim, J.; Lee, K.W. 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone attenuates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. P*LoS One* 2**014,** 9, e104938, doi:10.1371/journal.pone.0104938.
19. Heo, W.I.; Lee, K.E.; Hong, J.Y.; Kim, M.N.; Oh, M.S.; Kim, Y.S.; Kim, K.W.; Kim, K.E.; Sohn, M.H. The role of interleukin-17 in mouse models of atopic dermatitis and contact dermatitis. C*lin Exp Dermatol* 2**015,** 4*0,* 665-671, doi:10.1111/ced.12567.
20. Miyazaki, D.; Tominaga, T.; Yakura, K.; Kuo, C.H.; Komatsu, N.; Inoue, Y.; Ono, S.J. Conjunctival mast cell as a mediator of eosinophilic response in ocular allergy. M*ol Vis* 2**008,** 1*4,* 1525-1532.
21. Fukuda, K.; Ohbayashi, M.; Morohoshi, K.; Zhang, L.; Liu, F.T.; Ono, S.J. Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis. J *Allergy Clin Immunol* 2**009,** 1*24,* 827-833.e822, doi:10.1016/j.jaci.2009.06.012.
22. Saita, N.; Goto, E.; Yamamoto, T.; Cho, I.; Tsumori, K.; Kohrogi, H.; Maruo, K.; Ono, T.; Takeya, M.; Kashio, Y.; et al. Association of galectin-9 with eosinophil apoptosis. I*nt Arch Allergy Immunol* 2**002,** 1*28,* 42-50, doi:10.1159/000058002.
23. Yamamoto, H.; Kashio, Y.; Shoji, H.; Shinonaga, R.; Yoshimura, T.; Nishi, N.; Nabe, T.; Nakamura, T.; Kohno, S.; Hirashima, M. Involvement of galectin-9 in guinea pig allergic airway inflammation. I*nt Arch Allergy Immunol* 2**007,** 1*43 Suppl 1,* 95-105, doi:10.1159/000101414.

24. Sziksz, E.; Kozma, G.T.; Pállinger, E.; Komlósi, Z.I.; Adori, C.; Kovács, L.; Szebeni, B.; Rusai, K.; Losonczy, G.; Szabó, A.; et al. Galectin-9 in allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice. I*nt Arch Allergy Immunol 2***010,** 1*51,* 308-317, doi:10.1159/000250439.
25. Katoh, S.; Shimizu, H.; Obase, Y.; Oomizu, S.; Niki, T.; Ikeda, M.; Mouri, K.; Kobashi, Y.; Hirashima, M.; Oka, M. Preventive effect of galectin-9 on double-stranded RNA-induced airway hyperresponsiveness in an exacerbation model of mite antigen-induced asthma in mice. E*xp Lung Res 2***013,** *39,* 453-462, doi:10.3109/01902148.2013.850558.
26. Farag, A.G.A.; Al-Sharaky, D.R.; Allam, S.S.; Khaled, H.N. Role of Galectin-9 in Atopic Dermatitis - Is It Mediated Through E Selectin? A Clinical and Immunohistochemical Study. C*lin Cosmet Investig Dermatol 2***020,** 1*3,* 11-19, doi:10.2147/CCID.S229393.
27. Guttman-Yassky, E.; Bissonnette, R.; Ungar, B.; Suárez-Fariñas, M.; Ardeleanu, M.; Esaki, H.; Suprun, M.; Estrada, Y.; Xu, H.; Peng, X.; et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. J *Allergy Clin Immunol 2***019,** 1*43,* 155-172, doi:10.1016/j.jaci.2018.08.022.
28. de Kivit, S.; Saeland, E.; Kraneveld, A.D.; van de Kant, H.J.; Schouten, B.; van Esch, B.C.; Knol, J.; Sprikkelman, A.B.; van der Aa, L.B.; Knippels, L.M.; et al. Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans. A*llergy 2***012,** *67,* 343-352, doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02771.x.
29. Kim, H.W.; Ju, D.B.; Kye, Y.C.; Ju, Y.J.; Kim, C.G.; Lee, I.K.; Park, S.M.; Choi, I.S.; Cho, K.K.; Lee, S.H.; et al. Galectin-9 Induced by Dietary Probiotic Mixture Regulates Immune Balance to Reduce Atopic Dermatitis Symptoms in Mice. F*ront Immunol 2***019,** 1*0,* 3063, doi:10.3389/fimmu.2019.03063.
30. Dai, S.Y.; Nakagawa, R.; Itoh, A.; Murakami, H.; Kashio, Y.; Abe, H.; Katoh, S.; Kontani, K.; Kihara, M.; Zhang, S.L.; et al. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. J *Immunol 2***005,** 1*75,* 2974-2981, doi:10.4049/jimmunol.175.5.2974.
31. Ikeda, M.; Katoh, S.; Shimizu, H.; Hasegawa, A.; Ohashi-Doi, K.; Oka, M. Beneficial effects of Galectin-9 on allergen-specific sublingual immunotherapy in a Dermatophagoides farinae-induced mouse model of chronic asthma. A*llergol Int 2***017,** *66,* 432-439, doi:10.1016/j.alit.2016.10.007.
32. Katoh, S.; Ishii, N.; Nobumoto, A.; Takeshita, K.; Dai, S.Y.; Shinonaga, R.; Niki, T.; Nishi, N.; Tominaga, A.; Yamauchi, A.; et al. Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. A*m J Respir Crit Care Med 2***007,** 1*76,* 27-35, doi:10.1164/rccm.200608-1243OC.
33. Diehl, S.; Rincón, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. M*ol Immunol 2***002,** *39,* 531-536, doi:10.1016/s0161-5890(02)00210-9.
34. Chieosilapatham, P.; Kiatsurayanon, C.; Umehara, Y.; Trujillo-Paez, J.V.; Peng, G.; Yue, H.; Nguyen, L.T.H.; Niyonsaba, F. Keratinocytes: innate immune cells in atopic dermatitis. C*lin Exp Immunol 2***021,** doi:10.1111/cei.13575.
35. Nakajima, S.; Kitoh, A.; Egawa, G.; Natsuaki, Y.; Nakamizo, S.; Moniaga, C.S.; Otsuka, A.; Honda, T.; Hanakawa, S.; Amano, W.; et al. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. J *Invest Dermatol 2***014,** 1*34,* 2122-2130, doi:10.1038/jid.2014.51.
36. Asahina, R.; Maeda, S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. V*et Dermatol 2***017,** 2*8,* 16-e15, doi:10.1111/vde.12351.
37. Kameyoshi, Y.; Dörschner, A.; Mallet, A.I.; Christophers, E.; Schröder, J.M. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. J *Exp Med 1***992,** 1*76,* 587-592, doi:10.1084/jem.176.2.587.
38. Liu, F.T.; Goodarzi, H.; Chen, H.Y. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. C*lin Rev Allergy Immunol 2***011,** *41,* 298-310, doi:10.1007/s12016-011-8252-4.
39. Grewe, M.; Czech, W.; Morita, A.; Werfel, T.; Klammer, M.; Kapp, A.; Ruzicka, T.; Schöpf, E.; Krutmann, J. Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. J *Immunol 1***998,** 1*61,* 415-420.

40. Kasamatsu, A.; Uzawa, K.; Nakashima, D.; Koike, H.; Shiiba, M.; Bukawa, H.; Yokoe, H.; Tanzawa, H. Galectin-9 as a regulator of cellular adhesion in human oral squamous cell carcinoma cell lines. I*nt J Mol Med 2***005,** 1*6,* 269-273.
41. Brunner, P.M.; Guttman-Yassky, E.; Leung, D.Y. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. J *Allergy Clin Immunol 2***017,** 1*39,* S65-S76, doi:10.1016/j.jaci.2017.01.011.

4 CAPÍTULO 2 – Manuscrito: Galectin-1 and Galectin-3 in Atopic Dermatitis and Psoriasis: Potential Biomarkers and Immunoregulatory Roles

Galectin-1 and Galectin-3 in Atopic Dermatitis and Psoriasis: Potential Biomarkers and Immunoregulatory Roles

Mab Pereira Corrêa [1], Rebeca Donizete Correia-Silva [2], Gisela Rodrigues da Silva Sasso [2], Solange Corrêa Garcia Pires D'Ávila [3], Karin Vicente Greco [4]; Sonia Maria Oliani [1], Cristiane Damas Gil [1,2]

[1] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biociências, São José do Rio Preto, SP, Brazil

[2] Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina, Departamento de Morfologia e Genética, São Paulo, SP, Brazil

[3] Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Departamento de Patologia e Medicina Forense, São José do Rio Preto, SP, Brazil

[4] Division of Surgery and Interventional Science, The Griffin Institute, University College London (UCL), London, United Kingdom

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

Abstract

Background: The pathogenesis of atopic dermatitis (AD) and psoriasis (Ps) overlaps, particularly the activation of the immune response and tissue damage. Here, we evaluated galectin (Gal)-1 and Gal-3, which are beta-galactoside-binding proteins with immunomodulatory functions, as possible biomarkers for AD and Ps, and examined their effects on human keratinocytes stimulated with either interleukin (IL)-4 or IL-17A. Methods: Skin biopsies from AD, Ps, and control patients were evaluated using histological and immunohistochemical analyses. Six studies containing publicly available transcriptome data were individually analyzed using the GEO2R tool to detect Gal-1 and Gal-3 mRNA levels. In vitro, IL-4- or IL-17A-stimulated keratinocytes were treated with or without Gal-1 or Gal-3 to evaluate cytokine release and migration. Results: Our findings showed different patterns of expression for Gal-1 and Gal-3 protein and mRNA in AD and Ps epidermis. Gal-3 showed intense immunoreactivity in the epidermis of AD patients, with reduced intensity in Ps samples, whereas the opposite pattern was detected for Gal-1 (more strongly expressed in Ps). AD and Ps skins showed both Gal-1- and Gal-3-immunopositive inflammatory cells. After 24 hours, Gal-3 addition abrogated the release of IL-6 and RANTES in IL-4- and IL-17A-stimulated keratinocytes, whereas Gal-1 reduced the release of IL-6, IL-8, and RANTES in IL-17A-stimulated cells. Under IL-4 stimulation conditions, Gal-1 reduced keratinocyte migration rates, and under IL-17A stimulation conditions, both galectins increased cell migration compared with non-treated cells. Conclusion: Gal-1 and Gal-3 serve as potential biomarkers for Ps and AD skin biopsies, and their immunoregulatory and migration effects on keratinocytes make them interesting therapeutic tools.

Keywords: IL-4, IL-17A, Inflammation, HaCaT cells, Skin, Transcriptome

BACKGROUND

The skin is the largest organ in the human body, serving as both a physical and immunological protective barrier to prevent physical damage, dehydration, and pathogenic access [1-3]. Although keratinocytes are not immune cells, they can recruit and activate immune cells, inducing the production of cytokines, which can affect proliferation and form an inflammatory network [2]. When the protective mechanisms of the skin become dysfunctional, several types of inflammatory diseases can develop. Psoriasis (Ps) and atopic dermatitis (AD) are common chronic inflammatory diseases of the skin, driven by high production levels of the cytokines Th17 (interleukin [IL]-17A) and Th2 (IL-4 and IL-13) [2, 4, 5].

Ps is a chronic inflammatory skin disease with a strong genetic predisposition and a global prevalence that ranges from 0.51% to 11.4% [6]. In Ps, the IL-17/IL-23 axis is predominant, characterized by the activation of dendritic cells and T cells with Th1, Th17, and Th22 profiles, which promote the production of other cytokines, such as IL-20, IL-22, IL-26, IL-29, tumor necrosis factor (TNF)-α and the chemokines CCL20, CXCL1, and CXCL8-11 [5, 7, 8]. IL-20 and IL-22 contribute to the activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), a transcription factor that is responsible for increasing cell proliferation and is involved in Ps hyperplasia. STAT3 is indirectly produced by IL-17 through increased levels of IL-19/IL-36, which, in turn, activate STAT3 in the epidermis, leading to the early maturation of nucleated keratinocytes (parakeratosis) [8, 9].

AD is an allergic background disease, often associated with rhinitis, food allergy, and asthma, which affects 30% of children and 10% of adults worldwide [5, 10, 11]. The pathogenesis of AD has been attributed to alterations in the adaptive immune system and imbalances in the skin barrier that lead to transepidermal water loss and epithelial dysfunction. In AD, defects in auxiliary T cells (Th) reduce the terminal differentiation of keratinocytes [2, 5]. Th2 and Th22 lymphocytes are involved in the overloading of Langerhans cells and dendritic cells, and IL-22 also contributes to STAT3 activation, increasing keratinocyte proliferation (hyperplasia) in the epidermis. The high levels of IgE production in AD and during allergic reactions are driven by IL-4 and IL-13. Some types of AD are also associated with Th17 cells and increased by IL-17 levels, which stimulate STAT3 activation in keratinocytes [2, 8, 12].

The complex immune responses associated with these chronic skin inflammation disorders demonstrate the challenges faced by doctors when diagnosing these pathologies and determining appropriate therapeutic treatment strategies. Thus, the study of biomarkers is essential for better defining the heterogeneity associated with these pathologies and can contribute to the development of personalized therapies. In this regard, we highlight galectin-1 (Gal-1) and Gal-3, which are β-galactoside-binding proteins with potent regulatory roles in inflammatory skin diseases [13-15], as possible biomarkers for AD and Ps.

Lesional skin from Ps patients expresses low mRNA and protein levels of both Gal-1 and Gal-3 [16-18]. Additionally, Langerhans cells from lesional and nonlesional Ps skin demonstrate decreased levels of Gal-1 protein compared with healthy donor skin, which could contribute to the exacerbation of the

Th1/Th17 response in this disease [17]. Although Gal-1 and Gal-3 protein has been demonstrated to be upregulated in lesional skin from patients and mouse models with AD [19, 20], studies have shown that these galectins exert opposing effects on the regulation of allergic inflammation. Pharmacological treatment with Gal-1 decreased the clinical signs of AD and local levels of eotaxin and interferon (IFN)-γ and suppressed the infiltration of eosinophils and mast cells, which were correlated with reduced plasma IL-17 levels [20]. By contrast, galectin-3 deficiency produced the development of a Th1-polarized response that culminated in a marked reduction of allergic skin inflammation, suggesting that endogenous Gal-3 promotes allergic skin inflammation and drives a Th2-polarized response [19].
Considering the immunoregulatory roles and the different pattern of skin expression observed for Gal-1 and Gal-3, in this study, we evaluated both galectins as possible biomarkers for the differential diagnosis of AD and Ps, utilizing a two-pronged approach: i) immunohistochemistry and transcriptome analyses were performed to detect the respective protein and mRNA levels of Gal-1 and Gal-3 from human skin biopsies obtained from patients with Ps and AD; and ii) the biological effects of exogenous Gal-1 or Gal-3 administration on IL-4- and IL-17A-stimulated human keratinocytes in vitro.

MATERIAL AND METHODS

Human skin biopsies

Paraffin-embedded human skin biopsies, obtained from patients with confirmed AD (n = 9) and Ps (n = 10), based on clinical diagnosis and anatomopathological analyses, were provided by the Department of Pathology and Forensic Medicine, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), Brazil. For the control group, biopsies of clinically normal skin obtained from healthy patients were used (n = 10). The study was approved by the Ethics Committee in Research of Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (CEP 2.225.518/2017).

Skin thickness, histopathology, and quantification of inflammatory cells

Skin samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours and processed to paraffin embedding. Skin sections (3 μm) were stained with hematoxylin-eosin and Diff-Quick (Laborclin, Brazil), a rapid hematology stain based on the Romanowsky technique, for histopathology and inflammatory cell identification.

A 10× objective on an Axio Scope A1 Zeiss microscope (Carls Zeiss, Jena, Germany) was used to measure the skin thickness, which was measured perpendicular to the keratin layer from the epidermis to the hypodermis. For each section, three measurements of the epidermis + dermis were obtained at random intervals using AxioVision software (Carl Zeiss). Skin thickness values are presented as the mean ± the standard error of the mean (SEM) in mm. Using a 20× objective, the inflammatory infiltrate was classified as absent (0), mild (1), moderate (2), or intense (3), according to the number of inflammatory cells present in the tissue. Thus, each sample received a total inflammatory infiltrate score, ranging from 0 to 3+, and the data are expressed as the mean ± SEM for each group.

Immunohistochemistry: Gal-1 and Gal-3 levels

Immunohistochemistry was performed, as described previously [20]. Briefly, for Gal-1 and Gal-3 immunostaining, 3-µm-thick sections of human skin samples were incubated with polyclonal rabbit anti-Gal-1 or Gal-3 antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), diluted 1:200 in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin, for 16–18 hours at 4°C. After washing, the sections were incubated with a secondary biotinylated antibody (LAB-SA Detection kit, Thermo Fisher). Positive staining was detected using a peroxidase-conjugated streptavidin complex, and color was developed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate (Invitrogen). The sections were counterstained with hematoxylin. Densitometry analysis of Gal-1 and Gal-3 immunostaining was performed in the epidermis and dermis (n = 9–10 patients/group). The values were obtained as arbitrary units (a.u.) between 0 and 255 using AxioVision software on an Axioskop-2 Mot Plus Zeiss microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The data are expressed as the mean ± SEM in a. u.

Bioinformatics analysis

Six studies containing publicly available transcriptome data were selected from the Gene Expression Omnibus repository (GEOR): GSE120721 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE120721, accessed on 11 April 2021), which features skin samples from healthy individuals (control), and both lesioned and nonlesioned samples from AD patients; GSE16161 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE16161, accessed on 7 April 2021), which features skin samples from healthy individuals (control) and lesioned samples from AD patients; GSE130588 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE130588), which features control samples (healthy patients) and lesioned and nonlesioned skin samples from AD patients treated weekly with subcutaneous doses of 200 mg dupilumab for 16 weeks; GSE166388 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE166388, accessed on 22 April 2021), which features skin samples from healthy individuals (control) and lesioned samples from Ps patients; GSE106087 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE106087, accessed on 7 April 2021), which features neutrophils from healthy patients (control) and Ps patients; and GSE117239 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE117239, accessed on 24 April 2021), which features samples of nonlesioned and lesioned skin from Ps patients who were treated weekly for 12 weeks with either 90 mg ustekinumab or 50 mg etanercept. The datasets were individually analyzed using the license-free algorithms implemented in the GEO2R tool (available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/), which allows users to compare different groups of samples in a GEO series for the identification of differentially expressed genes according to experimental conditions. GEO2R was applied to detect Gal-1 (*LGALS1*) and Gal-3 (*LGALS3*) gene expression among the different experimental conditions. The p-values for gene expression after $\log_2$ transformation were used to calculate the Z-score (individual value − population average / population standard deviation).

Human keratinocyte culture and treatments

Normal human immortalized keratinocytes (HaCaT, CLS – Cell Line Service 300493) were grown in modified Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and supplemented

with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Br), 200 mM L-glutamine, 0.1 mg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin (Invitrogen, UK). Upon reaching 80% confluence, cells were trypsinized, centrifuged, and resuspended in 2 mL medium. Cells were counted, and viability was tested using Trypan blue before plating for experiments. Cells were plated at 1 × 104 cells/well in 96-well plates with 200 µL DMEM + 10% FBS and incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO2. After reaching 80% confluence (approximately 48 h), cells were submitted to the following experimental conditions: control (growth media) or stimulation with IL-4 or IL-17A (100 ng/mL), according to previous studies [21, 22]. After 15 minutes, cytokine-stimulated cells were treated with human recombinant Gal-1 or Gal-3 at 100 or 500 ng/mL. Recombinant human IL-4, IL-17A, Gal-1, and Gal-3 were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA).

Proinflammatory cytokine levels

Keratinocytes were cultured in 96-well plates at a concentration of 1×10^4 cells/well. After 24 h under different experimental conditions, IL-6, IL-8, and regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES)/CCL5 levels were detected in the cell supernatants using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (BD Biosciences, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions.

Scratch-wound assay

A total of 3×10^4 cells were seeded into 24-well plates and grown in DMEM medium to reach 80% confluence. A p200 pipet tip was used to scrape the cell monolayer in a straight line. Cells were washed twice with PBS to remove debris. Immediately, the cells were treated with either growth media (control), IL-4, or IL-17A (100 ng/mL), with or without Gal-1 or Gal-3 (100 and 500 ng/mL). Wound assays were observed from 6 to 48 h. The percentage decrease in the wound gap was calculated using AxioVision software (Zeiss) and normalized against the wound size at 0 h. To calculate the differences in wound closure, the wound closure of the control group was set to 100%, and the wound closures of all other groups were calculated as relative percentages compared to the control group.

Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad software version 9.00. The Kolmogorov–Smirnov test was used to determine the normality of the data. Data that passed the normality assumption were analyzed using analysis of variance (ANOVA), with Bonferroni post hoc test, or Student's t-test. Data that failed the normality assumption were analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's post hoc test or the Mann–Whitney U test. P-values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

AD and Ps skin samples are characterized by intense inflammatory influx and epidermal thickening

Skin lesions obtained from patients with AD were characterized by a thickening of the epidermis, caused by acanthosis (hyperplasia of the spinous layer of the epidermis), with elongation of epidermal crypts, mild spongiosis (accumulation of fluids in the epidermis, leading to the formation of intraepidermal

vesicles) and foci of parakeratosis (Fig. 1a–c). In the dermis, foci of perivascular inflammatory infiltrate, which were predominantly lymphocytic, were observed, in addition to the presence of eosinophils and degranulated mast cells (Fig. 1b and f). In skin obtained from Ps lesions, we detected hyperplastic epidermis with elongated epidermal ridges and thinning over the dermal papillae, with the presence of hyperkeratosis and parakeratosis (Fig. 1d–f). In the dermis, we also observed lymphocytic inflammatory infiltrates (Fig. 1f). Our histopathological findings were corroborated by the marked increase of the epidermal thickness and inflammatory infiltrate scores for both Ps and AD samples compared with those of the control group (Fig. 1h and i).

AD and Ps skin samples present different pattern of Gal-1 and Gal-3 protein and mRNA expression

Immunohistochemistry was performed to define the expression patterns of Gal-1 and Gal-3 proteins in skin samples obtained from patients across all conditions. In the control skin samples, keratinocyte nuclei were positive for Gal-3, with weak immunoreactivity against Gal-1, whereas the dermis showed positive resident cells for both galectins (Fig. 2a and b). In the AD samples, the inflammatory infiltrates displayed strong immunoreactivity for Gal-1 and Gal-3, whereas the epidermis presented intense immunostaining for Gal-3 in the keratinocyte cytoplasm compared with the cells in the control skin samples (Fig. 2c and d). In the Ps skin samples, keratinocytes showed intense nuclear and cytoplasmic immunoreactivity for Gal-1, whereas Gal-3 showed a predominantly strong nuclear immunoreactivity (Fig. 2e and f). The inflammatory infiltrate displays the same pattern of expression observed in the AD sample, with strong immunoreactivity for both galectins.

Transcriptome analyses from the GSE120721 and GSE16161 studies showed decreased levels of Gal-1 and Gal-3 mRNA expression in both nonlesioned and lesioned skin from patients with AD compared with skin from control (healthy) individuals (Fig. 3a and b). Interestingly, mRNA transcriptomics from the GSE130588 study showed that treatment with dupilumab, an efficient biological therapeutic agent for AD that inhibits the signaling of both IL-4 and IL-13 [23], downregulated the transcriptional levels of LGALS1 in both nonlesioned and lesioned AD skin samples compared with the level in controls samples after 16 weeks of treatment (Fig. 3c). Lesioned AD skin also showed decreased transcriptional levels of LGALS3 during week 0 of drug treatment compared with the control and nonlesioned skin (Fig. 3c), which was maintained after 16 weeks of dupilumab treatment.

The transcriptome of Ps skin from the GSE166388 study showed that LGALS3 levels were downregulated compared with the level in control skin, whereas no significant alterations were detected for LGALS1 levels (Fig. 3d). Curiously, neutrophils from Ps skin showed increased levels of both Gal-1 and Gal-3 mRNA, as detected in the transcriptome from the GSE106087 study (Fig. 3e). Finally, the transcriptomes of nonlesioned and lesioned Ps skin samples from the GSE117239 study showed increased levels of Gal-1 mRNA after 12 weeks of treatment with ustekinumab, a human monoclonal antibody that binds to IL-12/IL-23 [24], or etanercept, a recombinant human TNF-receptor [25], which both result in rapid and substantial improvements in the clinical manifestations of Ps [26]. Gal-3 mRNA

levels were also significantly increased in Ps lesions after 12-weeks of etanercept treatment compared with the level at week 0 in Ps lesions (Fig. 3f).

Effect of exogenous administration of Gal-1 and Gal-3 on keratinocytes

After detecting Gal-1 and Gal-3 expression in the skin, we determined their immunomodulatory roles in the keratinocytes under conditions of IL-4 or IL-17A stimulation, which we used to mimic the AD and Ps microenvironments, respectively. After 24 h, IL-4-stimulated keratinocytes significantly increased IL-6 production, which was abrogated by the administration of Gal-3 at 500 ng/mL (Fig. 4a). No effects of Gal-3 or Gal-1 administration were observed on the production of IL-8 or RANTES by keratinocytes stimulated with IL-4 (Fig. 4b and c). Under IL-17A stimulation conditions, Gal-1 administration at 100 ng/mL was sufficiently potent to significantly diminish the production of IL-6, IL-8, and RANTES compared with IL-17A-stimulated cells without Gal-1 treatment (Fig. 4d–f). Gal-3 treatment at 100 ng/ml reversed the effects on IL-6 production induced by IL-17A stimulation in keratinocytes (Fig. 4d), and at both concentrations (100 and 500 ng/mL), Gal-3 significantly reduced RANTES release compared with stimulated cells without Gal-3 treatment (Fig. 4f).

The scratch-wound assay was performed to evaluate the effects of Gal-1 and Gal-3 treatment on keratinocyte migration. Under IL-4 stimulation conditions, Gal-1 treatment at both concentrations significantly reduced the rate of keratinocyte migration compared with the control, whereas no differences were detected for Gal-3 treatment (Fig. 5a). However, under IL-17A stimulation conditions, both galectins increased the rate of cell migration in comparison to control cells (Fig. 5b).

DISCUSSION

In this study, we evaluated the patterns of Gal-1 and Gal-3 protein expression in AD and Ps lesioned skins and examined their gene transcription levels using studies containing publicly available transcriptome data to verify the applications of both galectins as potential differentiating biomarkers for these inflammatory cutaneous diseases. Additionally, we investigated the exogenous roles played by both Gal-1 and Gal-3 in human keratinocytes in AD (IL-4 stimulation) and Ps (IL-17A stimulation) mimetic microenvironments.

Histopathological analyses showed the intense inflammatory influx of cells positive for Gal-1 and Gal-3 in the AD and Ps dermis, corroborating the findings of previous studies [16, 18-20]. These lectins are expressed and released by inflammatory cells that mediate allergic responses (Th2 profile), such as mast cells and eosinophils [27-29], and inflammatory responses, such as neutrophils, macrophages, and lymphocytes, which have Th1/Th17 profiles [27, 30-32]. The immunoregulatory effects of Gal-1 and Gal-3 on inflammatory cells, in general, are antagonistic. Gal-1 inhibits mast cell degranulation and eosinophil activation and migration [28, 29, 33], whereas Gal-3 promotes mast cell degranulation and eosinophil migration [34-36]. The experimental models of AD reinforce these differential effects of Gal-1 and Gal-3 under allergic conditions. Pharmacological treatment with Gal-1 reduces the clinical signs

of AD, decreasing mast cell and eosinophil influx and reducing the local production of eotaxin and IFN-γ [20]. By contrast, AD animals deficient in Gal-3 exhibited reduced eosinophil infiltration, serum IgE, and cutaneous IL-4 mRNA levels compared with wild-type mice [19].

Gal-1 and Gal-3 also exhibit robust and differential modulatory effects for neutrophils and T cells, implicating the galectin family as key regulators of both innate and adaptive immune responses. In vivo and in vitro experimental models of inflammation show the potent inhibitory effects of Gal-1 on the recruitment of neutrophils [37-39] and lymphocytes [40] and its pro-resolving role in the induction of phosphatidylserine exposure to facilitate leukocyte turnover [41, 42]. Gal-3 acts as an adhesion molecule for neutrophils, facilitating their interactions with endothelial cells and consequent motility and extravasation to the tissue [43-45]. Gal-3 but not Gal-1 induces both phosphatidylserine exposure and apoptosis in primary activated human T cells, whereas both Gal-1 and Gal-3 induce phosphatidylserine exposure in neutrophils in the absence of cell death [46]. These findings demonstrate that leukocytes have distinct responses to Gal-1 and Gal-3, which may reflect differences in their turnover and function.

In addition to different patterns of expression in inflammatory cells, immunohistochemical analyses revealed different patterns of expression for Gal-1 and Gal-3 in the epidermis of AD and Ps patients. Gal-3 showed intense immunoreactivity in the epidermis of patients with AD and was less intense in patients with Ps, whereas the opposite was true for Gal-1, which was more strongly expressed in keratinocytes from patients with Ps than AD. Additionally, Gal-3 was detected in the nucleus of keratinocytes derived from healthy skin (controls), an expression pattern that was maintained in the AD skin but not the Ps skin. Similar observations for Gal-3 protein expression were demonstrated in Ps and AD lesional skin [16, 18]. However, no expression of Gal-1 was detected in normal and Ps epidermal cells, and no evidence of nuclear staining was observed for either Gal-1 or Gal-3 in normal and Ps skin samples [16].

In the nucleus, Gal-1 and Gal-3 are involved in the pre-mRNA splicing process through interactions with Gemin4, a member of the survival motor neuron protein complex that plays an essential role in the production of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins [47, 48]. Additionally, the nuclear positivity of Gal-1 was associated with a low level of differentiation among epithelial cells [49, 50], whereas the expression of Gal-3 on the cell surface was characteristic of post-mitotic keratinocytes, which harbor properties similar to terminally differentiated or replication-senescent cells without undergoing terminal differentiation [49]. Upregulated levels of Gal-1 but not Gal-3 in the skin have been detected during wound repair in pigs and rats, indicating the differential regulation of galectins during this repair process [50, 51]. In the cytoplasm, Gal-3 might antagonize apoptosis through its interaction with Bcl-2 protein, a well-known apoptotic repressor [52-54]. In fact, Gal-3-deficient keratinocytes were more sensitive to UVB-induced apoptosis and other apoptotic stimuli than wild-type cells, which was attributed to increased extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation and decreased AKT activation after UVB irradiation [55]. In addition, silencing Gal-3 expression altered keratinocyte differentiation due to the downregulation of keratin10 and filaggrin mRNA expression and

the upregulation of involucrin, in addition to increased cell apoptotic rates after TNF stimulation [18]. Along this line, our immunohistochemical data suggested that the marked expression of endogenous Gal-1 and Gal-3 in the epidermal cells of Ps and AD skin, respectively, are important for activating the intracellular machinery required for successful wound healing and protection against the rapid process of apoptosis.

Transcriptome analyses of public data showed that Gal-3 mRNA levels were downregulated in AD and Ps lesioned skin compared with the levels in control skin (GSE16161 and GSE166388, respectively), whereas Gal-1 mRNA levels were downregulated only in AD skin (GSE120721), with no significant alterations detected between Ps lesioned skin and healthy skin (GSE166388). Other studies have also shown that the levels of Gal-3 mRNA are also low in lesioned Ps skin compared with the skin of healthy subjects, whereas Gal-1 levels were downregulated in both nonlesional and lesional Ps samples [17]. Curiously, our analysis showed that neutrophils from Ps skin presented increased levels of both Gal-1 and Gal-3 mRNA (GSE106087), suggesting that these cells may serve as an important source for both galectins during the inflammatory process. Discrepancies in immunohistochemical and transcriptomic analyses in our study can be explained by the fact that immunohistochemistry identifies the specific skin localization of target proteins, whereas transcriptomics represents a global analysis of mRNA transcripts throughout the whole skin sample. The biological therapies used to treat AD and Ps differently regulate the transcriptional levels of LGALS1, causing downregulation in both nonlesioned and lesioned AD skin (dupilumab 16 weeks; GSE130588) and upregulation in Ps lesioned skin (ustekinumab and etanercept 12 weeks; GSE117239). Gal-3 mRNA levels were also significantly increased in Ps lesioned skin after 12 weeks of etanercept treatment compared with the level at week 0 (GSE117239). These data indicated that the biological blockade of the IL-4/IL-13 axis (AD Th2 profile) favors reduced levels of Gal-1 mRNA, whereas the blockade of TNF or IL-12/IL-23 signaling (Ps Th1 profile) favors increased levels of both Gal-1 and Gal-3 mRNA. The dynamic regulation of galectin gene transcription levels during AD and Ps reinforces the roles played by these proteins during skin wound healing, and such changes may identify a potential target for the development of novel drugs for patient care.

Keratinocytes are the major source of cytokines in the epidermis [56-58], and we verified the immunomodulatory effects of Gal-1 and Gal-3 in human keratinocytes stimulated by IL-4 or IL-17. The administration of Gal-1 at the lowest tested concentration reduced the release of IL-8 and RANTES by IL-17-stimulated keratinocytes and reversed the effects of IL-17 on IL-6 release. Gal-3 reduced the release of IL-6 by keratinocytes under both IL-4 and IL-17A stimulation conditions and inhibited RANTES released under IL-17A stimulation conditions. Our findings showed that both Gal-1 and Gal-3 have important immunoregulatory effects on the epidermis, resulting in the reduced production of IL-6, IL-8, and RANTES, which are mediators that activate and attract leukocytes to the site of skin inflammation [59, 60].

Finally, under IL-4 stimulation conditions, Gal-1 treatment reduced the rate of keratinocyte migration compared with the control, whereas no differences were detected for Gal-3 treatment. However, under

IL-17A stimulation, both galectins increased cell migration in comparison to control cells. A scratch assay performed in HaCaTs using antibodies to neutralize Gal-1 in the conditioned medium of adipose-derived stem cells (ADSC-CM) significantly reduced cell migration compared with ADSC-CMs treated with Gal-1, suggesting that Gal-1 may serve as a promising option for therapeutic wound-healing remedies [61]. Gal-1 can promote epithelial cell–extracellular matrix cross-linking through laminins, fibronectins, and other glycoproteins presented in the basement membrane, which provide the necessary epitopes for this lectin [62]. Recombinant Gal-3 has also been shown to induce keratinocyte migration, possibly through an extracellular interaction with beta 4 integrin and laminin on the keratinocyte matrix [63]. Confirming this aspect, silencing Gal-3 expression in HaCaT cells delayed their migration 24 and 48 h after the initiation of the scratch assay without affecting cell proliferation [18].

CONCLUSIONS

Collectively, our data reveal that Gal-1 and Gal-3 may serve as potential biomarkers for Ps and AD skin biopsies, and their immunoregulatory, proliferative, and migration effects on keratinocytes make them potential therapeutic tools.

ABBREVIATIONS

AD – Atopic Dermatitis
Ps – Psoriasis
Gal – Galectin
TNF – Tumor necrosis factor
IFN – interferon
HaCaT – Normal human immortalized keratinocytes
GEOR – Gene Expression Omnibus repository

DECLARATIONS

Ethics approval

The study with human skin biopsies and cell line was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of FAMERP in the meeting of 17 August 2017 (protocol code 2.225.518).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

All transcriptomes' data were selected from the GEOR (available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/):
GSE120721 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE120721, accessed on 11 April 2021); GSE16161 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE16161, accessed on 7 April 2021;

GSE130588 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE130588), accessed on 7 April 2021; GSE166388 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE166388, accessed on 22 April 2021); GSE106087 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE106087, accessed on 7 April 2021); GSE117239 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE117239, accessed on 24 April 2021).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant number 2017/26872-5 (CDG). MPC was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Finance Code 001).

Author contributions

Conceptualization: [Mab Pereira Corrêa], [Cristiane Damas Gil]; Methodology: [Mab Pereira Corrêa], [Rebeca Donizete Correia-Silva], [Gisela Rodrigues da Silva Sasso], [Solange Corrêa Garcia Pires D'Ávila], [Karin Vicente Greco]; Formal analysis and investigation: [Mab Pereira Corrêa]; Writing - original draft preparation: [Mab Pereira Corrêa], [Cristiane Damas Gil]; Writing - review and editing: [Karin Vicente Greco], [Sonia Maria Oliani]; Funding acquisition: [Cristiane Damas Gil]; Resources: [Karin Vicente Greco], [Sonia Maria Oliani], [Cristiane Damas Gil]; Supervision: [Cristiane Damas Gil].

Acknowledgments

The authors thank Mr. Paulo Celso Franco from the Department of Morphology and Genetics, UNIFESP, for his skillful technical assistance.

REFERENCES

1. Bocheńska, K., E. Smolińska, M. Moskot, J. Jakóbkiewicz-Banecka and M. Gabig-Cimińska. "Models in the research process of psoriasis." *Int J Mol Sci* 18 (2017): 10.3390/ijms18122514. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29186769.

2. Dainichi, T., A. Kitoh, A. Otsuka, S. Nakajima, T. Nomura, D. H. Kaplan and K. Kabashima. "The epithelial immune microenvironment (eime) in atopic dermatitis and psoriasis." *Nat Immunol* 19 (2018): 1286-98. 10.1038/s41590-018-0256-2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30446754.

3. Cui, H., Y. Chai and Y. Yu. "Progress in developing decellularized bioscaffolds for enhancing skin construction." *J Biomed Mater Res A* 107 (2019): 1849-59. 10.1002/jbm.a.36688. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30942934.

4. Griffiths, C. E., P. van de Kerkhof and M. Czarnecka-Operacz. "Psoriasis and atopic dermatitis." *Dermatol Ther (Heidelb)* 7 (2017): 31-41. 10.1007/s13555-016-0167-9. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28150106.

5. Guttman-Yassky, E. and J. G. Krueger. "Atopic dermatitis and psoriasis: Two different immune diseases or one spectrum?" *Curr Opin Immunol* 48 (2017): 68-73. 10.1016/j.coi.2017.08.008. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28869867.

6. Michalek, I. M., B. Loring and S. M. John. "A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis." *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31 (2017): 205-12. 10.1111/jdv.13854. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573025.

7. Chiricozzi, A., P. Romanelli, E. Volpe, G. Borsellino and M. Romanelli. "Scanning the immunopathogenesis of psoriasis." *Int J Mol Sci* 19 (2018): 10.3390/ijms19010179. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316717.

8. Guttman-Yassky, E., J. G. Krueger and M. G. Lebwohl. "Systemic immune mechanisms in atopic dermatitis and psoriasis with implications for treatment." *Exp Dermatol* 27 (2018): 409-17. 10.1111/exd.13336. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28266782.

9. Nograles, K. E., L. C. Zaba, A. Shemer, J. Fuentes-Duculan, I. Cardinale, T. Kikuchi, M. Ramon, R. Bergman, J. G. Krueger and E. Guttman-Yassky. "Il-22-producing "T22" T cells account for upregulated il-22 in atopic dermatitis despite reduced il-17-producing th17 t cells." *J Allergy Clin Immunol* 123 (2009): 1244-52.e2. 10.1016/j.jaci.2009.03.041. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439349.

10. Bieber, T. "Atopic dermatitis." *N Engl J Med* 358 (2008): 1483-94. 10.1056/NEJMra074081. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385500.

11. Sacotte, R. and J. I. Silverberg. "Epidemiology of adult atopic dermatitis." *Clin Dermatol* 36 (2018): 595-605. 10.1016/j.clindermatol.2018.05.007. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30217272.

12. Dhingra, N., N. Gulati and E. Guttman-Yassky. "Mechanisms of contact sensitization offer insights into the role of barrier defects vs. Intrinsic immune abnormalities as drivers of atopic dermatitis." *J Invest Dermatol* 133 (2013): 2311-14. 10.1038/jid.2013.239. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030647.

13. Wu, N. L. and F. T. Liu. "The expression and function of galectins in skin physiology and pathology." *Exp Dermatol* 27 (2018): 217-26. 10.1111/exd.13512. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427464.

14. Pasmatzi, E., C. Papadionysiou, A. Monastirli, G. Badavanis and D. Tsambaos. "Galectin 1 in dermatology: Current knowledge and perspectives." *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 28 (2019): 27-31. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30901066.

15. Pasmatzi, E., C. Papadionysiou, A. Monastirli, G. Badavanis and D. Tsambaos. "Galectin 3: An extraordinary multifunctional protein in dermatology. Current knowledge and perspectives." *An Bras Dermatol* 94 (2019): 348-54. 10.1590/abd1806-4841.20198426. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31365668.

16. Lacina, L., Z. Plzáková, K. Smetana, J. Stork, H. Kaltner and S. André. "Glycophenotype of psoriatic skin." *Folia Biol (Praha)* 52 (2006): 10-5. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17007105.

17. de la Fuente, H., S. Perez-Gala, P. Bonay, A. Cruz-Adalia, D. Cibrian, S. Sanchez-Cuellar, E. Dauden, M. Fresno, A. García-Diez and F. Sanchez-Madrid. "Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells." *J Pathol* 228 (2012): 193-203. 10.1002/path.3996. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271227.

18. Shi, Z. R., G. Z. Tan, C. X. Cao, Y. F. Han, Z. Meng, X. Y. Man, Z. X. Jiang, Y. P. Zhang, N. N. Dang, K. H. Wei*, et al.* "Decrease of galectin-3 in keratinocytes: A potential diagnostic marker and a critical contributor to the pathogenesis of psoriasis." *J Autoimmun* 89 (2018): 30-40. 10.1016/j.jaut.2017.11.002. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29167025.

19. Saegusa, J., D. K. Hsu, H. Y. Chen, L. Yu, A. Fermin, M. A. Fung and F. T. Liu. "Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis." *Am J Pathol* 174 (2009): 922-31. 10.2353/ajpath.2009.080500. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179612.

20. Corrêa, M. P., F. E. C. Andrade, A. D. Gimenes and C. D. Gil. "Anti-inflammatory effect of galectin-1 in a murine model of atopic dermatitis." *J Mol Med (Berl)* (2017): 10.1007/s00109-017-1566-9. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28664215.

21. Bao, L., G. C. Mohan, J. B. Alexander, C. Doo, K. Shen, J. Bao and L. S. Chan. "A molecular mechanism for il-4 suppression of loricrin transcription in epidermal keratinocytes: Implication for atopic dermatitis pathogenesis." *Innate Immun* 23 (2017): 641-47. 10.1177/1753425917732823. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28952836.

22. Cho, K. A., M. Park, Y. H. Kim and S. Y. Woo. "Th17 cell-mediated immune responses promote mast cell proliferation by triggering stem cell factor in keratinocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 487 (2017): 856-61. 10.1016/j.bbrc.2017.04.141. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28456630.

23. Zhou, S., F. Qi, Y. Gong, J. Zhang and B. Zhu. "Biological therapies for atopic dermatitis: A systematic review." *Dermatology* (2021): 1-11. 10.1159/000514535. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33735876.

24. Lebwohl, M., K. Papp, C. Han, B. Schenkel, N. Yeilding, Y. Wang and G. G. Krueger. "Ustekinumab improves health-related quality of life in patients with moderate-to-severe psoriasis: Results from the phoenix 1 trial." *Br J Dermatol* 162 (2010): 137-46. 10.1111/j.1365-2133.2009.09491.x. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903183.

25. Leonardi, C. L., J. L. Powers, R. T. Matheson, B. S. Goffe, R. Zitnik, A. Wang, A. B. Gottlieb and E. P. S. Group. "Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis." *N Engl J Med* 349 (2003): 2014-22. 10.1056/NEJMoa030409. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627786.

26. Sbidian, E., A. Chaimani, I. Garcia-Doval, L. Doney, C. Dressler, C. Hua, C. Hughes, L. Naldi, S. Afach and L. Le Cleach. "Systemic pharmacological treatments for chronic plaque psoriasis: A network meta-analysis." *Cochrane Database Syst Rev* 4 (2021): CD011535. 10.1002/14651858.CD011535.pub4. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33871055.

27. Gil, C. D., D. Cooper, G. Rosignoli, M. Perretti and S. M. Oliani. "Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis." *Inflamm Res* 55 (2006): 99-107. 10.1007/s00011-005-0059-4. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16673152.

28. Mello, C. B., L. Ramos, A. D. Gimenes, T. R. Andrade, S. M. Oliani and C. D. Gil. "Immunomodulatory effects of galectin-1 on an ige-mediated allergic conjunctivitis model." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56 (2015): 693-704. 10.1167/iovs.14-15100. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25574053.

29. Ge, X. N., S. G. Ha, Y. G. Greenberg, A. Rao, I. Bastan, A. G. Blidner, S. P. Rao, G. A. Rabinovich and P. Sriramarao. "Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (2016): E4837-46. 10.1073/pnas.1601958113. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27457925.

30. Rabinovich, G. A., M. M. Iglesias, N. M. Modesti, L. F. Castagna, C. Wolfenstein-Todel, C. M. Riera and C. E. Sotomayor. "Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that

induces apoptosis of t cells: Biochemical and functional characterization." *J Immunol* 160 (1998): 4831-40. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590230.

31. Gil, C. D., M. La, M. Perretti and S. M. Oliani. "Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3." *Cell Biol Int* 30 (2006): 338-44. 10.1016/j.cellbi.2005.12.010. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530434.

32. Iqbal, A. J., D. Cooper, A. Vugler, B. R. Gittens, A. Moore and M. Perretti. "Endogenous galectin-1 exerts tonic inhibition on experimental arthritis." *J Immunol* 191 (2013): 171-7. 10.4049/jimmunol.1203291. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720814.

33. Mello-Bosnic, C., A. D. Gimenes, S. M. Oliani and C. D. Gil. "Treatment with galectin-1 eye drops regulates mast cell degranulation and attenuates the severity of conjunctivitis." *Eur J Pharmacol* 833 (2018): 124-30. 10.1016/j.ejphar.2018.05.046. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29859836.

34. Zuberi, R. I., L. G. Frigeri and F. T. Liu. "Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon bp, an ige-binding endogenous lectin." *Cell Immunol* 156 (1994): 1-12. 10.1006/cimm.1994.1148. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8200029.

35. Zuberi, R. I., D. K. Hsu, O. Kalayci, H. Y. Chen, H. K. Sheldon, L. Yu, J. R. Apgar, T. Kawakami, C. M. Lilly and F. T. Liu. "Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma." *Am J Pathol* 165 (2004): 2045-53. 10.1016/S0002-9440(10)63255-5. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579447.

36. Rao, S. P., Z. Wang, R. I. Zuberi, L. Sikora, N. S. Bahaie, B. L. Zuraw, F. T. Liu and P. Sriramarao. "Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow." *J Immunol* 179 (2007): 7800-7. 10.4049/jimmunol.179.11.7800. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025226.

37. La, M., T. V. Cao, G. Cerchiaro, K. Chilton, J. Hirabayashi, K. Kasai, S. M. Oliani, Y. Chernajovsky and M. Perretti. "A novel biological activity for galectin-1: Inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation." *Am J Pathol* 163 (2003): 1505-15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507657.

38. Cooper, D., L. V. Norling and M. Perretti. "Novel insights into the inhibitory effects of galectin-1 on neutrophil recruitment under flow." *J Leukoc Biol* 83 (2008): 1459-66. 10.1189/jlb.1207831. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372340.

39. Gil, C. D., C. E. Gullo and S. M. Oliani. "Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: Modulation of cytokine levels and adhesion molecules." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 4 (2011): 74-84. <Go to ISI>://WOS:000293509500007.

40. Norling, L. V., A. L. Sampaio, D. Cooper and M. Perretti. "Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking." *FASEB J* 22 (2008): 682-90. fj.07-9268com [pii]10.1096/fj.07-9268com. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965266.

41. Dias-Baruffi, M., H. Zhu, M. Cho, S. Karmakar, R. P. McEver and R. D. Cummings. "Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis." J *Biol Chem* 278 (2003): 41282-93. 10.1074/jbc.M306624200. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853445.

42. Stowell, S. R., S. Karmakar, C. J. Stowell, M. Dias-Baruffi, R. P. McEver and R. D. Cummings. "Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated t cells." B*lood* 109 (2007): 219-27. 10.1182/blood-2006-03-007153. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940423.

43. Sato, S., N. Ouellet, I. Pelletier, M. Simard, A. Rancourt and M. G. Bergeron. "Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia." J *Immunol* 168 (2002): 1813-22. 10.4049/jimmunol.168.4.1813. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823514.

44. Fernández, G. C., J. M. Ilarregui, C. J. Rubel, M. A. Toscano, S. A. Gómez, M. Beigier Bompadre, M. A. Isturiz, G. A. Rabinovich and M. S. Palermo. "Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: Involvement of alternative mapk

pathways." *Glycobiology 15* (2005): 519-27. cwi026 [pii]10.1093/glycob/cwi026. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604089.

45. Snarr, B. D., G. St-Pierre, B. Ralph, M. Lehoux, Y. Sato, A. Rancourt, T. Takazono, S. R. Baistrocchi, R. Corsini, M. P. Cheng, *et al.* "Galectin-3 enhances neutrophil motility and extravasation into the airways during aspergillus fumigatus infection." PL*oS Pathog 16* (2020): e1008741. 10.1371/journal.ppat.1008741. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32750085.

46. Stowell, S. R., Y. Qian, S. Karmakar, N. S. Koyama, M. Dias-Baruffi, H. Leffler, R. P. McEver and R. D. Cummings. "Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion." J *Immunol 180* (2008): 3091-102. 10.4049/jimmunol.180.5.3091. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292532.

47. Patterson, R. J., W. Wang and J. L. Wang. "Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus." Gl*ycoconj J 19* (2002): 499-506. 10.1023/B:GLYC.0000014079.87862.c7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758073.

48. Hsu, D. K., R. Y. Yang, J. Saegusa and F. T. Liu. "Analysis of the intracellular role of galectins in cell growth and apoptosis." Me*thods Mol Biol 120*7 (2015): 451-63. 10.1007/978-1-4939-1396-1_29. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253158.

49. Chovanec, M., K. Smetana, B. Dvoránková, Z. Plzáková, S. André and H. J. Gabius. "Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for galectin-1 and -3." An*at Histol Embryol 33* (2004): 348-54. 10.1111/j.1439-0264.2004.00568.x. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15540994.

50. Klíma, J., L. Lacina, B. Dvoránková, D. Herrmann, J. W. Carnwath, H. Niemann, H. Kaltner, S. André, J. Motlík, H. J. Gabius, *et al.* "Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration." Ph*ysiol Res 58* (2009): 873-84. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093745.

51. Gál, P., T. Vasilenko, M. Kostelníková, J. Jakubco, I. Kovác, F. Sabol, S. André, H. Kaltner, H. J. Gabius and K. Smetana. "Open wound healing in vivo: Monitoring binding and presence of adhesion/growth-regulatory galectins in rat skin during the course of complete re-epithelialization." Ac*ta Histochem Cytochem 44* (2011): 191-9. 10.1267/ahc.11014. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096259.

52. Akahani, S., P. Nangia-Makker, H. Inohara, H. R. Kim and A. Raz. "Galectin-3: A novel antiapoptotic molecule with a functional bh1 (nwgr) domain of bcl-2 family." Ca*ncer Res 57* (1997): 5272-6. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393748.

53. Hsu, D. K., R. Y. Yang, Z. Pan, L. Yu, D. R. Salomon, W. P. Fung-Leung and F. T. Liu. "Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses." Am *J Pathol 156* (2000): 1073-83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702423.

54. Wang, J. L., R. M. Gray, K. C. Haudek and R. J. Patterson. "Nucleocytoplasmic lectins." Bi*ochim Biophys Acta 167*3 (2004): 75-93. S0304416504000704 [pii]10.1016/j.bbagen.2004.03.013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15238251.

55. Saegusa, J., D. K. Hsu, W. Liu, I. Kuwabara, Y. Kuwabara, L. Yu and F. T. Liu. "Galectin-3 protects keratinocytes from uvb-induced apoptosis by enhancing akt activation and suppressing erk activation." J I*nvest Dermatol 128* (2008): 2403-11. 10.1038/jid.2008.119. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18463681.

56. Ansel, J., P. Perry, J. Brown, D. Damm, T. Phan, C. Hart, T. Luger and S. Hefeneider. "Cytokine modulation of keratinocyte cytokines." J I*nvest Dermatol 94* (1990): 101S-07S. 10.1111/1523-1747.ep12876053. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161884.

57. Tüzün, Y., M. Antonov, N. Dolar and R. Wolf. "Keratinocyte cytokine and chemokine receptors." Der*matol Clin 25* (2007): 467-76, vii. 10.1016/j.det.2007.06.003. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17903606.

58. Qiao, P., W. Guo, Y. Ke, H. Fang, Y. Zhuang, M. Jiang, J. Zhang, S. Shen, H. Qiao, E. Dang, e*t al.* "Mechanical stretch exacerbates psoriasis by stimulating keratinocyte proliferation and cytokine production." J I*nvest Dermatol 139* (2019): 1470-79. 10.1016/j.jid.2018.12.019. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30641039.

59. Pastore, S., F. Mascia and G. Girolomoni. "The contribution of keratinocytes to the pathogenesis of atopic dermatitis." Eur *J Dermatol 16* (2006): 125-31. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581561.

60. Haque, A. and H. Woolery-Lloyd. "Inflammaging in dermatology: A new frontier for research." J D*rugs Dermatol 20* (2021): 144-49. 10.36849/JDD.5481. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538570.

61. Kim, M. H., W. H. Wu, J. H. Choi, J. Kim, J. H. Jun, Y. Ko and J. H. Lee. "Galectin-1 from conditioned medium of three-dimensional culture of adipose-derived stem cells accelerates migration and proliferation of human keratinocytes and fibroblasts." Wou*nd Repair Regen 26* Suppl 1 (2018): S9-S18. 10.1111/wrr.12579. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28857355.

62. Elola, M. T., F. Ferragut, S. P. Méndez-Huergo, D. O. Croci, C. Bracalente and G. A. Rabinovich. "Galectins: Multitask signaling molecules linking fibroblast, endothelial and immune cell programs in the tumor microenvironment." Cel*l Immunol 333* (2018): 34-45. 10.1016/j.cellimm.2018.03.008. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29602445.

63. Kariya, Y., C. Kawamura, T. Tabei and J. Gu. "Bisecting glcnac residues on laminin-332 down-regulate galectin-3-dependent keratinocyte motility." J B*iol Chem 285* (2010): 3330-40. 10.1074/jbc.M109.038836. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940114.

Figures

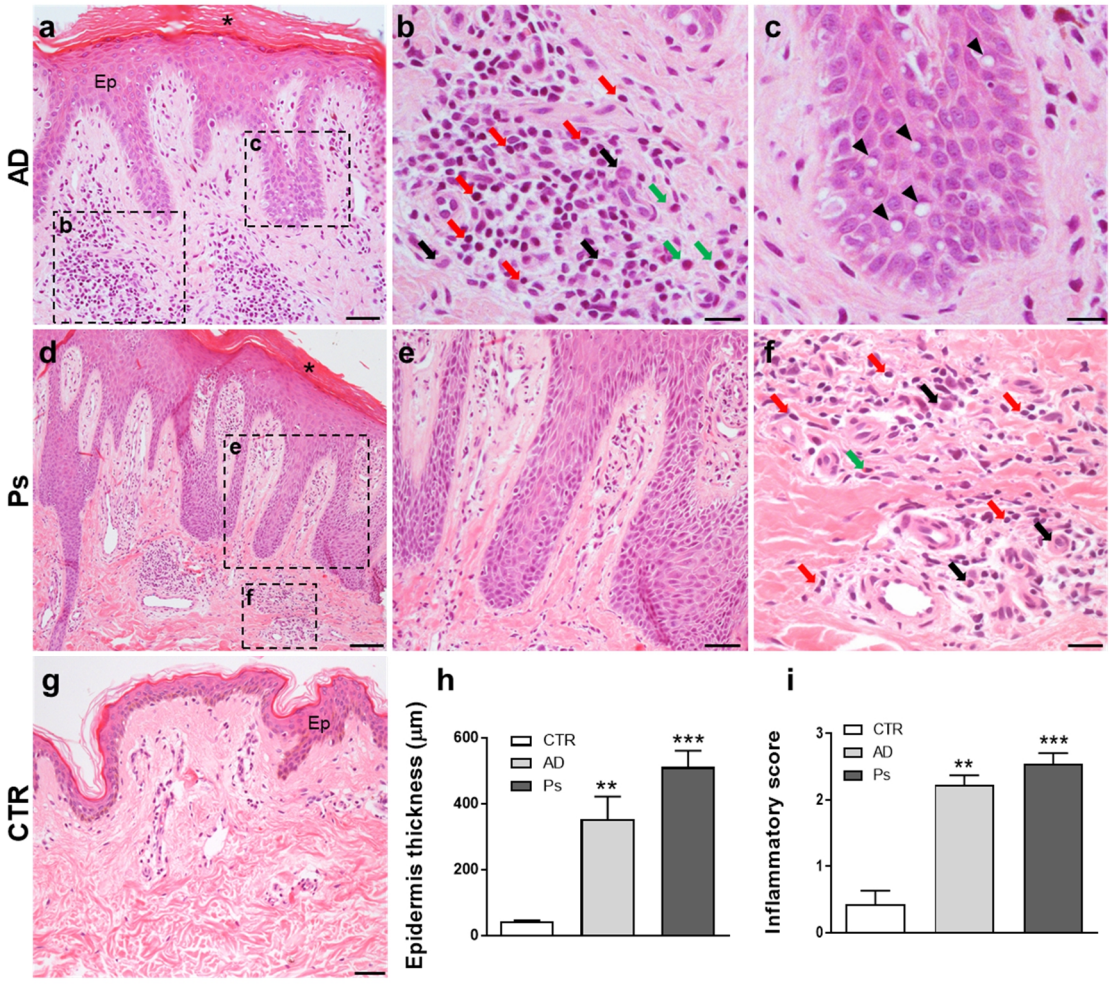


Fig. 1 Histopathological findings. **a**, **d**: Atopic dermatitis (AD) and psoriasis (Ps) skins were characterized by acanthosis (Ep), with elongation of epidermal crypts, hyperkeratosis (*), and inflammatory cell influx in the dermis. **b**, **f**: T cells (red arrows), eosinophils (green arrows), and monocytes (black arrows). **c**: Spongiosis in the epidermis, leading to the formation of intraepidermal vesicles (arrowheads). **g**: Control skin (CTR). Stain: Hematoxylin-eosin. **h**, **i**: Epidermis thickness in micrometers (µm) and inflammatory score in the dermis. Data represent the mean ± SEM of n = 9–10 patients/group analyzed. Scale bars **a, d, g** = 50 µm; **b, c, e, f** = 20 µm. **P < 0.01, ***P < 0.001 *vs* control (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

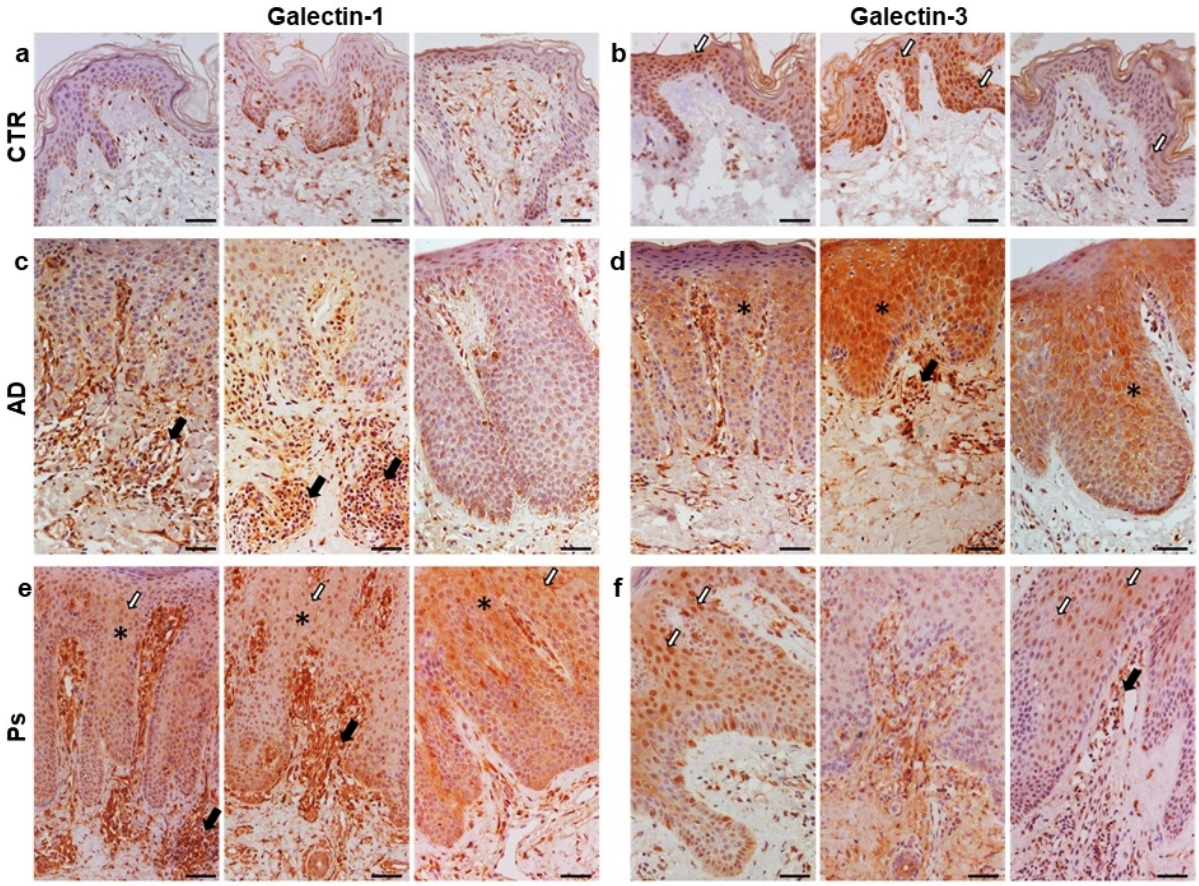


Fig. 2 Gal-1 and Gal-3 protein expression in the skin. Three representative photomicrographs of control (healthy) [**a, b**]; atopic dermatitis (AD) [**c, d**] and psoriasis (Ps) skin [**e, f**]. Intense immunoreactivity for Gal-1 and Gal-3 were detected in inflammatory infiltrates (black arrows) in AD and Ps. In the epidermis, the expression of Gal-1 was more intense (asterisks) in Ps compared with AD and CTR, whereas Gal-3 levels were more intense (asterisks) in AD compared with the other conditions. Keratinocytes show nuclear expression (white arrows) of Gal-1 in Ps and Gal-3 in the CTR and Ps conditions. Counterstaining: Hematoxylin. Scale Bars: 50 μm

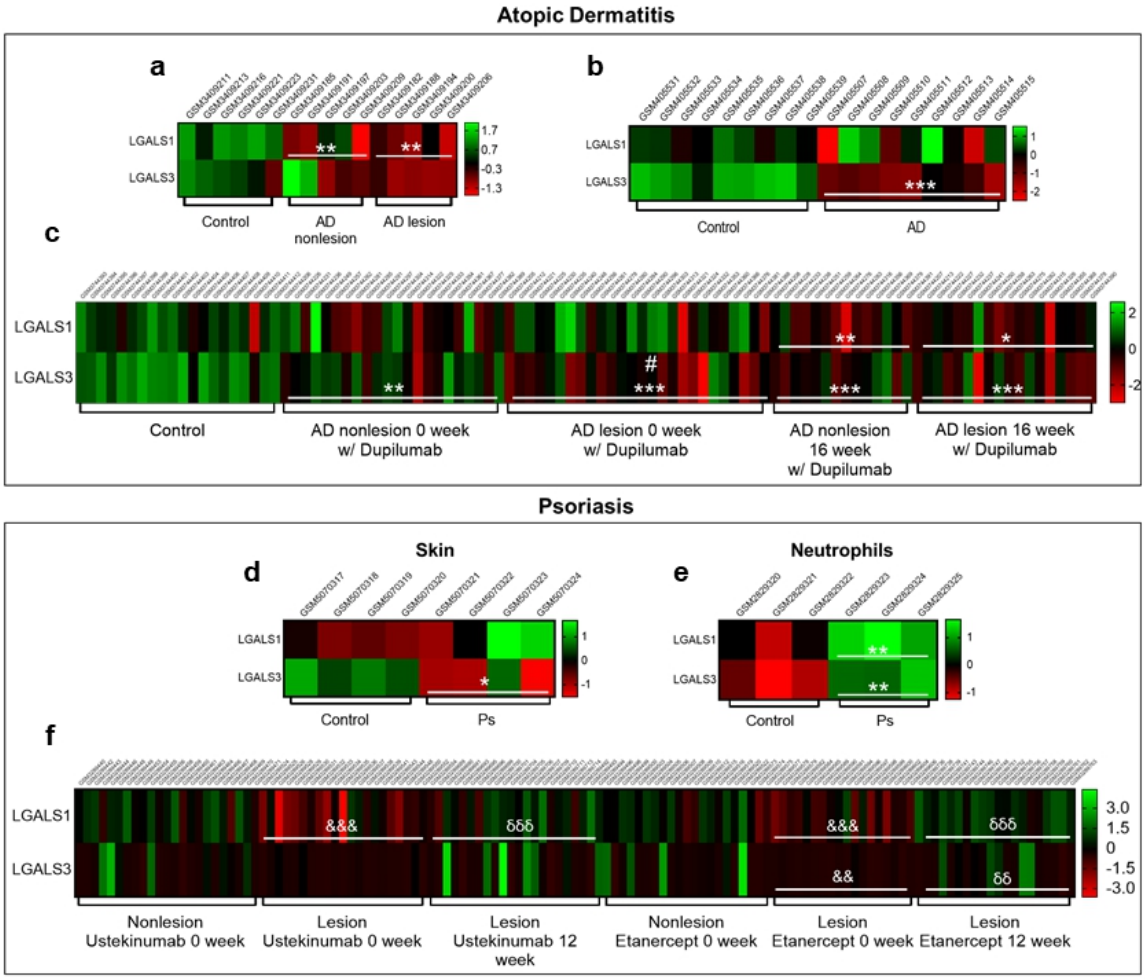


Fig. 3 Heatmaps based on the Z-scores of *LGALS1* and *LGALS3* transcriptional levels. **a–c**: Atopic Dermatitis. Gal-1 and Gal-3 mRNA were analyzed in the healthy (control) skin and lesioned, and nonlesioned skin from AD patients (GSE120721) [**a**]; control and AD human skin (GSE16161) [**b**]; lesioned and nonlesioned skins from AD patients who were treated weekly with subcutaneous doses of 200 mg dupilumab for 16 weeks (GSE130588) [**c**]. **d–f:** Psoriasis. Gal-1 and Gal-3 mRNA were analyzed in control and Ps human skin (GSE160388) [**d**]; neutrophils from Ps and healthy patients (GSE106087) [**e**]; lesioned and nonlesioned skins from Ps patients treated weekly with doses of 90 mg of Ustekinumab or 50 mg of Etanercept for 12 weeks (GSE117239) [**f**]. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. control (skin or neutrophils); # P < 0.05 *vs.* AD nonlesioned skin; && P < 0.01, &&& P < 0.001 *vs*. Ps nonlesioned 0 week of the correspondent treatment; δδ P < 0.01, δδδ P < 0.001 vs. *Ps* lesion 0 week of correspondent treatment. **a**, **c,** and **f**: ANOVA or Kruskal–Wallis followed by Bonferroni or Dunn's post hoc test, respectively. **b**, **d,** and **e**: t-test

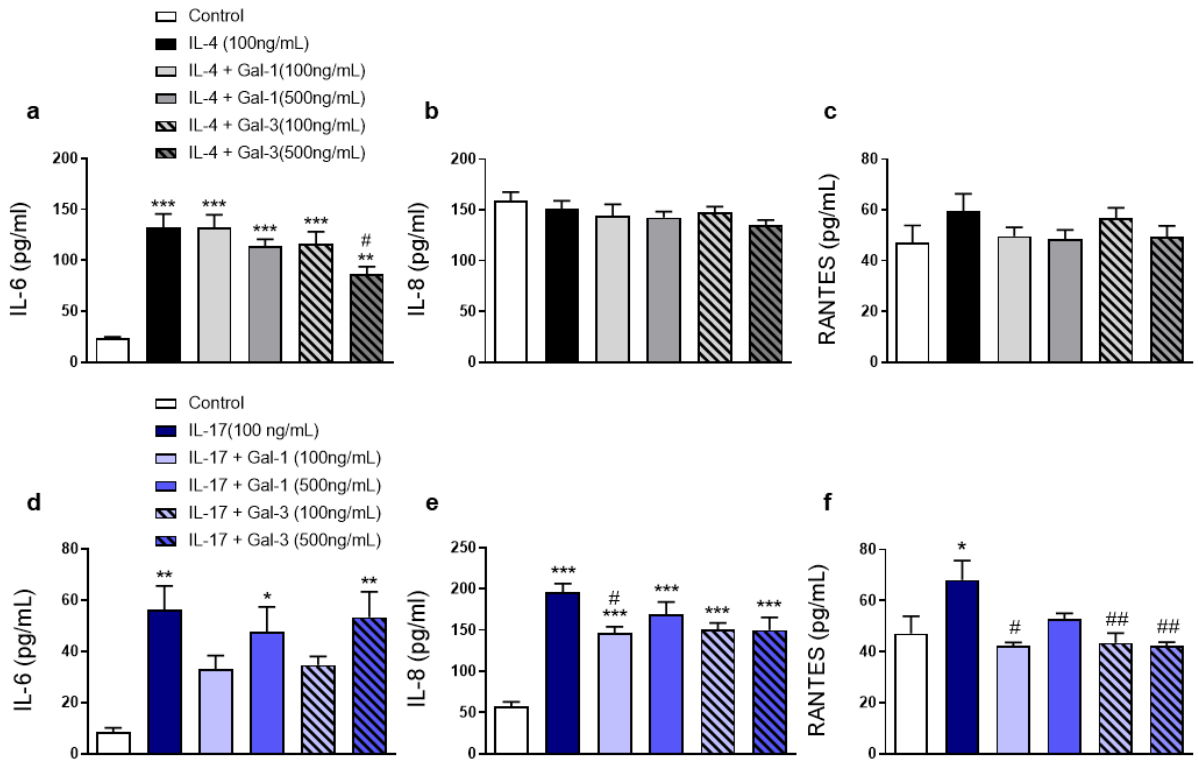


Fig. 4 Immunomodulatory effect of Gal-1 and Gal-3 on human keratinocytes. HaCaT cells were submitted to the following experimental conditions: control (growth media), stimulated with IL-4 (100 ng/mL; **a–c**) or IL-17A (100 ng/mL; **d–f**) for 15 minutes, followed by human recombinant Gal-1 or Gal-3 at 100 or 500 ng/ml or media. After 24 hours, ELISA was performed to determine cytokine release. **a**, **d**: IL-6 levels. **b, e:** IL-8 levels. **c, f:** RANTES levels. Data represent the mean ± SEM of protein levels (pg/mL). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 *vs*. Control; #P < 0.05; ##P < 0.01 *vs*. IL-4 or IL-17A (ANOVA, Bonferroni post hoc test)

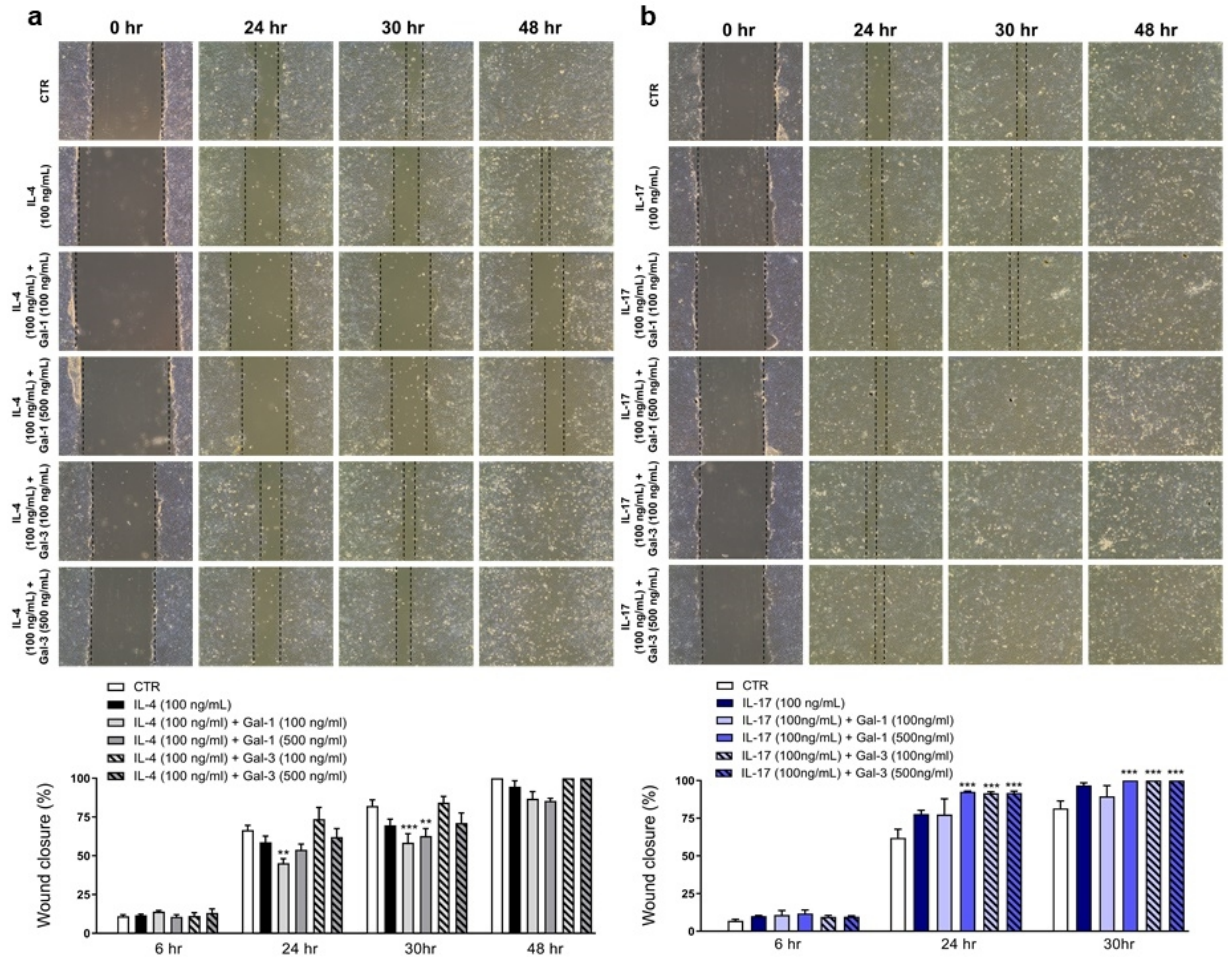


Fig. 5 Scratch assay: assessment of HaCaT migration rate after cytokine stimulation and Gal-1 or Gal-3 treatments. HaCaT cells were submitted to the following experimental conditions: control (growth media), stimulated with IL-4 or IL-17A (100 ng/mL) for 15 minutes, followed by human recombinant Gal-1 or Gal-3 (100 or 500 ng/mL) or media. Wound assays were observed from 6 to 48 hours. Representative photomicrographs show the effects of Gal-1 or Gal-3 treatments on keratinocytes under IL-4 (**a**) or IL-17A (**b**) stimulation conditions compared to non-treated conditions. Data represent the mean ± SEM of wound closure (%). **P < 0.01; ***P < 0.001 *vs*. Control at correspondent time (ANOVA, Bonferroni post hoc test).

5 CONCLUSÕES

- Em relação à Gal-9 na DA:

1. A Gal-9 tem seus níveis aumentados em queratinócitos na DA murina e humana;
2. Em camundongos, mastócitos e eosinófilos são fonte potencial dessa lectina na inflamação causada pela DA;
3. A análise de transcriptomas mostra que a pele lesionada tem aumento dos níveis do RNAm da Gal-9, enquanto a pele sem lesão de pacientes com DA e após o tratamento com Dupilumabe, tem seus níveis reduzidos;
4. A Gal-9 exógena tem efeito imunomodulador e na proliferação de queratinócitos estimulados por citocinas presentes na DA;

- Em relação às Gal-1 e -3 na DA e Ps:

1. As lesões com DA apresentam intensa imunorreatividade para a proteína Gal-3 na epiderme, enquanto as lesões de Ps apresentam expressão mais intensa de Gal-1 na epiderme.
2. Os níveis de RNAm da Gal-1 são reduzidos na pele com DA e nenhuma alteração significativa foi detectada entre as lesões de Ps e a pele saudável.
3. Os níveis de RNAm da Gal-3 são reduzidos nas lesões de pele com DA e Ps em comparação com a pele controle.
4. *In vitro,* as Gal-1 e Gal-3 mostraram efeitos imunomoduladores e migratórios em queratinócitos estimulados por IL-4- ou IL-17.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que níveis aumentados da Gal-9 na patogênese da DA representam uma etapa importante para a contrarregulação da resposta inflamatória da pele e proliferação da epiderme. Também, que as Gal-1 e Gal-3 representam potenciais biomarcadores para biópsias de pele com Ps e DA, e seus efeitos imunomoduladores e de migração nos queratinócitos as tornam importantes ferramentas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 9ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. ISBN 978-85-352-9074-5

AHMAD, N. et al. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. **J Biol Chem,** v. 279, n. 12, p. 10841-7, Mar 19 2004. ISSN 0021-9258. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672941 >.

AKIMOTO, Y. et al. Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. **Cell Tissue Res,** v. 280, n. 1, p. 1-10, Apr 1995. ISSN 0302-766X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7750127 >.

ALBERTS, B. **Essential cell biology**. Fifth edition. New York: W. W. Norton & Company, 2018. ISBN 9780393428643 PDF 0393428648.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol,** v. 30, n. 3, p. 257-62, 2012 May-Jun 2012. ISSN 1879-1131. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507037 >.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J Cell Biol,** v. 106, n. 3, p. 761-71, Mar 1988. ISSN 0021-9525. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450098 >.

BRUNNER, P. M.; GUTTMAN-YASSKY, E. Racial differences in atopic dermatitis. **Ann Allergy Asthma Immunol,** v. 122, n. 5, p. 449-455, May 2019. ISSN 1534-4436. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30465859 >.

BUKA, R. L. et al. Etanercept is minimally effective in 2 children with atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol,** v. 53, n. 2, p. 358-9, Aug 2005. ISSN 1097-6787. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021144 >.

BYLUND, S. et al. Prevalence and Incidence of Atopic Dermatitis: A Systematic Review. **Acta Derm Venereol,** v. 100, n. 12, p. adv00160, Jun 2020. ISSN 1651-2057. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32412646 >.

CASTRO, C. R. et al. Evaluation of depression, stress and quality of life indexes in patients with atopic dermatitis. **An Bras Dermatol**, Jul 2021. ISSN 1806-4841. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34281740 >.

CHAN, Y. C. et al. Dissecting the Structure-Activity Relationship of Galectin-Ligand Interactions. **Int J Mol Sci,** v. 19, n. 2, Jan 2018. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29382172 >.

CHEN, H. L. et al. Galectin-7 Regulates Keratinocyte Proliferation and Differentiation through JNK-miR-203-p63 Signaling. **J Invest Dermatol,** v. 136, n. 1, p. 182-191, Jan 2016. ISSN 1523-1747. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26763438 >.

CHIEOSILAPATHAM, P. et al. Keratinocytes: innate immune cells in atopic dermatitis. **Clin Exp Immunol**, Jan 2021. ISSN 1365-2249. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33460469 >.

CHIRICOZZI, A. et al. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. **Int J Mol Sci,** v. 19, n. 1, Jan 2018. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316717 >.

CLARK, R. A. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. **J Invest Dermatol,** v. 130, n. 2, p. 362-70, Feb 2010. ISSN 1523-1747. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19675575 >.

COGHI, S. et al. Quality of life is severely compromised in adult patients with atopic dermatitis in Brazil, especially due to mental components. **Clinics (Sao Paulo),** v. 62, n. 3, p. 235-42, Jun 2007. ISSN 1807-5932. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589662 >.

CORRÊA, C. C. In: **Mãe:** porções, posses e poções. São José do Rio Preto: Editora Ponto Z, 2021. 31p.

CORRÊA, M. P. et al. The Role of Galectin-9 as Mediator of Atopic Dermatitis: Effect on Keratinocytes. **Cells,** v. 10, n. 4, Apr 2021. ISSN 2073-4409. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33923930 >.

DAINICHI, T. et al. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. **Nat Immunol,** v. 19, n. 12, p. 1286-1298, 12 2018. ISSN 1529-2916. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30446754 >.

DALOTTO-MORENO, T. et al. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. **Cancer Res,** v. 73, n. 3, p. 1107-17, Feb 01 2013. ISSN 1538-7445. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204230 >.

DE LA FUENTE, H. et al. Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. **J Pathol,** v. 228, n. 2, p. 193-203, Oct 2012. ISSN 1096-9896. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271227 >.

DHINGRA, N.; GULATI, N.; GUTTMAN-YASSKY, E. Mechanisms of contact sensitization offer insights into the role of barrier defects vs. intrinsic immune abnormalities as drivers of atopic dermatitis. **J Invest Dermatol,** v. 133, n. 10, p. 2311-2314, Oct 2013. ISSN 1523-1747. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030647 >.

DONETTI, E. et al. The psoriatic shift induced by interleukin 17 is promptly reverted by a specific anti-IL-17A agent in a three-dimensional organotypic model of normal human skin culture. **Eur J Histochem,** v. 64, n. 2, Apr 2020. ISSN 2038-8306. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32312032 >.

FARAG, A. G. A. et al. Role of Galectin-9 in Atopic Dermatitis - Is It Mediated Through E Selectin? A Clinical and Immunohistochemical Study. **Clin Cosmet Investig Dermatol,** v. 13, p. 11-19, 2020. ISSN 1178-7015. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32021366 >.

FARHADI, S. A.; HUDALLA, G. A. Engineering galectin-glycan interactions for immunotherapy and immunomodulation. **Exp Biol Med (Maywood),** v. 241, n. 10, p. 1074-83, 05 2016. ISSN 1535-3699. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27229902 >.

FURUE, M. Interleukin-31 and Pruritic Skin. **J Clin Med,** v. 10, n. 9, Apr 2021. ISSN 2077-0383. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33924978 >.

GRÖNE, A. Keratinocytes and cytokines. **Vet Immunol Immunopathol,** v. 88, n. 1-2, p. 1-12, Sep 2002. ISSN 0165-2427. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088639 >.

GUTTMAN-YASSKY, E.; KRUEGER, J. G. Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? **Curr Opin Immunol,** v. 48, p. 68-73, Oct 2017. ISSN 1879-0372. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28869867 >.

GUTTMAN-YASSKY, E.; KRUEGER, J. G.; LEBWOHL, M. G. Systemic immune mechanisms in atopic dermatitis and psoriasis with implications for treatment. **Exp Dermatol,** v. 27, n. 4, p. 409-417, 04 2018. ISSN 1600-0625. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28266782 >.

GUTTMAN-YASSKY, E.; NOGRALES, K. E.; KRUEGER, J. G. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts. **J Allergy Clin Immunol,** v. 127, n. 5, p. 1110-8, May 2011. ISSN 1097-6825. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388665 >.

JACOBI, A. et al. Infliximab in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol,** v. 52, n. 3 Pt 1, p. 522-6, Mar 2005. ISSN 1097-6787. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761436 >.

JOHANNES, L.; JACOB, R.; LEFFLER, H. Galectins at a glance. **J Cell Sci,** v. 131, n. 9, 05 2018. ISSN 1477-9137. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29717004 >.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia básica: texto e atlas**. 13ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. ISBN 978-85-277-3216-1

KABASHIMA, K. et al. The immunological anatomy of the skin. **Nat Rev Immunol,** v. 19, n. 1, p. 19-30, 01 2019. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30429578 >.

KABASHIMA, K. et al. Trial of Nemolizumab and Topical Agents for Atopic Dermatitis with Pruritus. **N Engl J Med,** v. 383, n. 2, p. 141-150, 07 2020. ISSN 1533-4406. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32640132 >.

KAMILI, N. A. et al. Key regulators of galectin-glycan interactions. **Proteomics,** v. 16, n. 24, p. 3111-3125, 12 2016. ISSN 1615-9861. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27582340 >.

KAPUR, S.; WATSON, W.; CARR, S. Atopic dermatitis. **Allergy Asthma Clin Immunol,** v. 14, n. Suppl 2, p. 52, 2018. ISSN 1710-1484. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30275844 >.

KHATER, M. H. et al. Evaluation of Galectin3 levels in psoriatic patients treated by narrow-band UVB phototherapy. **J Dermatolog Treat,** v. 31, n. 8, p. 758-762, Dec 2020. ISSN 1471-1753. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31557066 >.

KIM, Y.; LIM, K. M. Skin barrier dysfunction and filaggrin. **Arch Pharm Res,** v. 44, n. 1, p. 36-48, Jan 2021. ISSN 0253-6269. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33462753 >.

KOCH, A. et al. Galectin-3, a novel centrosome-associated protein, required for epithelial morphogenesis. **Mol Biol Cell,** v. 21, n. 2, p. 219-31, Jan 15 2010. ISSN 1939-4586. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923323 >.

LARSEN, L. et al. Galectin-3 and the skin. **J Dermatol Sci,** v. 64, n. 2, p. 85-91, Nov 2011. ISSN 1873-569X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889881 >.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plast Surg Clin North Am,** v. 25, n. 3, p. 283-289, Aug 2017. ISSN 1558-1926. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676156 >.

LUGER, T. et al. Pimecrolimus in atopic dermatitis: consensus on safety and the need to allow use in infants. **Pediatr Allergy Immunol,** v. 26, n. 4, p. 306-15, Jun 2015. ISSN 1399-3038. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557211 >.

MICHALEK, I. M.; LORING, B.; JOHN, S. M. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol,** v. 31, n. 2, p. 205-212, Feb 2017. ISSN 1468-3083. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573025 >.

MILANESI, N. et al. Effect of dupilumab on sleep disturbances in adult patients with severe atopic dermatitis. **Ital J Dermatol Venerol**, Jul 2021. ISSN 2784-8450. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34282867 >.

MURPHY, M.; KERR, P.; GRANT-KELS, J. M. The histopathologic spectrum of psoriasis. **Clin Dermatol,** v. 25, n. 6, p. 524-8, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0738-081X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021888 >.

NAKAJIMA, R. et al. Elevated serum galectin-9 levels in patients with atopic dermatitis. **J Dermatol,** v. 42, n. 7, p. 723-6, Jul 2015. ISSN 1346-8138. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25899120 >.

NEDOSZYTKO, B. et al. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. **Postepy Dermatol Alergol,** v. 31, n. 2, p. 84-91, May 2014. ISSN 1642-395X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097473 >.

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol,** v. 9, n. 10, p. 679-91, Oct 2009. ISSN 1474-1741. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19763149 >.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **Int J Mol Sci,** v. 20, n. 8, Apr 2019. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31013709 >.

NIEMINEN, J. et al. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. **J Biol Chem,** v. 282, n. 2, p. 1374-83, Jan 12 2007. ISSN 0021-9258. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082191 >.

NIWA, H. et al. Stable form of galectin-9, a Tim-3 ligand, inhibits contact hypersensitivity and psoriatic reactions: a potent therapeutic tool for Th1- and/or Th17-mediated skin inflammation. **Clin Immunol,** v. 132, n. 2, p. 184-94, Aug 2009. ISSN 1521-7035. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464955 >.

NODA, S.; KRUEGER, J. G.; GUTTMAN-YASSKY, E. The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases. **J Allergy Clin Immunol,** v. 135, n. 2, p. 324-36, Feb 2015. ISSN 1097-6825. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25541257 >.

OLDHOFF, J. M. et al. Anti-IL-5 recombinant humanized monoclonal antibody (mepolizumab) for the treatment of atopic dermatitis. **Allergy,** v. 60, n. 5, p. 693-6, May 2005. ISSN 0105-4538. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15813818 >.

OLIVEIRA, M. E. F.; ROCHA, B. E. O.; DUARTE, G. V. Psoriasis: classical and emerging comorbidities. **An Bras Dermatol,** v. 90, n. 1, p. 9-20, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1806-4841. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25672294 >.

PELLETIER, I.; SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by Leishmania major through species-specific polygalactose epitope. **J Biol Chem,** v. 277, n. 20, p. 17663-70, May 17 2002. ISSN 0021-9258. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882664 >.

PETIT, R. G. et al. Psoriasis: From Pathogenesis to Pharmacological and Nano-Technological-Based Therapeutics. **Int J Mol Sci,** v. 22, n. 9, May 2021. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34067151 >.

RADONJIC-HOESLI, S. et al. Eosinophils in skin diseases. **Semin Immunopathol,** v. 43, n. 3, p. 393-409, Jun 2021. ISSN 1863-2300. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34097126 >.

RENDON, A.; SCHÄKEL, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. **Int J Mol Sci,** v. 20, n. 6, Mar 2019. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30909615 >.

RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. **Cells,** v. 8, n. 6, 06 2019. ISSN 2073-4409. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31216669 >.

RIVITTI, E. A. **Dermatologia de Sampaio e Rivitti**. 4ª edição. São Paulo: Artes Médicas, 2018. ISBN 978-85-277-3216-1

ROTHFUSS, P. **O temor do sábio**. São Paulo: Editora Arqueiro, 2011. 545p.

SACOTTE, R.; SILVERBERG, J. I. Epidemiology of adult atopic dermatitis. **Clin Dermatol,** v. 36, n. 5, p. 595-605, 2018 Sep - Oct 2018. ISSN 1879-1131. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30217272 >.

SAEGUSA, J. et al. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. **Am J Pathol,** v. 174, n. 3, p. 922-31, Mar 2009. ISSN 1525-2191. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179612 >.

SALOMONSSON, E. et al. Monovalent interactions of galectin-1. **Biochemistry,** v. 49, n. 44, p. 9518-32, Nov 09 2010. ISSN 1520-4995. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20873803 >.

SILVERBERG, J. I. et al. Atopic dermatitis in the pediatric population: A cross-sectional, international epidemiologic study. **Ann Allergy Asthma Immunol,** v. 126, n. 4, p. 417-428.e2, 04 2021. ISSN 1534-4436. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33421555 >.

SLOMINSKI, A. T.; MANNA, P. R.; TUCKEY, R. C. On the role of skin in the regulation of local and systemic steroidogenic activities. **Steroids,** v. 103, p. 72-88, Nov 2015. ISSN 1878-5867. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988614 >.

SYED, F. et al. Fibroblasts from the growing margin of keloid scars produce higher levels of collagen I and III compared with intralesional and extralesional sites: clinical implications for lesional site-directed therapy. **Br J Dermatol,** v. 164, n. 1, p. 83-96, Jan 2011. ISSN 1365-2133. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20849516 >.

TEICHBERG, V. I. et al. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of Electrophorus electricus. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 72, n. 4, p. 1383-7, Apr 1975. ISSN 0027-8424. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1055413 >.

THAN, N. G. et al. Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia. **J Pathol Transl Med,** v. 49, n. 3, p. 181-208, May 2015. ISSN 2383-7837. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018511 >.

TOKUMARU, S. et al. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. **J Immunol,** v. 175, n. 7, p. 4662-8, Oct 2005. ISSN 0022-1767. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177113 >.

TSAKOVSKA, I. et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology,** v. 387, p. 27-42, 07 2017. ISSN 1879-3185. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28645577 >.

VASTA, G. R. et al. Galectins as self/non-self-recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. **Front Immunol,** v. 3, p. 199, 2012. ISSN 1664-3224. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811679 >.

VOSS, M. et al. Mast Cells in the Skin: Defenders of Integrity or Offenders in Inflammation? **Int J Mol Sci,** v. 22, n. 9, Apr 2021. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33925601 >.

ZOUBOULIS, C. C. The skin as an endocrine organ. **Dermatoendocrinol**, v. 1, n. 5, p. 250-2, Sep 2009. ISSN 1938-1980. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808511>.

WILGUS, T. A.; WULFF, B. C. The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring. **Adv Wound Care (New Rochelle),** v. 3, n. 4, p. 356-365, Apr 2014. ISSN 2162-1918. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24757590 >.

WONG, L. S.; YEN, Y. T.; LEE, C. H. The Implications of Pruritogens in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. **Int J Mol Sci,** v. 22, n. 13, Jul 2021. ISSN 1422-0067. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34281281 >.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Exp Dermatol,** v. 25, n. 2, p. 92-8, Feb 2016. ISSN 1600-0625. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284579 >.

WU, N. L.; LIU, F. T. The expression and function of galectins in skin physiology and pathology. **Exp Dermatol,** v. 27, n. 3, p. 217-226, 03 2018. ISSN 1600-0625. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427464 >.

YANEZ, D. A. et al. The role of macrophages in skin homeostasis. **Pflugers Arch,** v. 469, n. 3-4, p. 455-463, 04 2017. ISSN 1432-2013. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233123 >.

APÊNDICE A – Galectin-3: role in ocular allergy and potential as a predictive biomarker

Laboratory science

Galectin-3: role in ocular allergy and potential as a predictive biomarker

Frans Eberth Costa Andrade,[1] Mab Pereira Corrêa,[2] Alexandre Dantas Gimenes,[1] Myrna Serapião dos Santos,[3] Mauro Campos,[3] Roger Chammas,[4] José Álvaro Pereira Gomes,[3] Cristiane Damas Gil[1,2]

[1]Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP—Universidade Federal de São Paulo, Sao Paulo, Brazil
[2]Programa de Pós-Graduação em Biociências, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP—Universidade Estadual Paulista, Sao Jose do Rio Preto, Brazil
[3]Departamento de Oftalmologia e Ciências Visuais, UNIFESP—Universidade Federal de São Paulo, Sao Paulo, Brazil
[4]Departamento de Radiologia e Oncologia, FMUSP—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Sao Paulo, Brazil

Correspondence to
Dr Cristiane Damas Gil, Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP -Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 04023-900, Brazil; cristiane.gil@unifesp.br

Received 17 October 2017
Revised 31 January 2018
Accepted 16 February 2018
Published Online First 3 March 2018

Check for updates

To cite: Andrade FEC, Corrêa MP, Gimenes AD, *et al*. *Br J Ophthalmol* 2018;**102**:1003–1010.

ABSTRACT

Aims To evaluate galectin-3 (Gal-3), a β-galactoside binding protein, as a possible biomarker in ocular allergy and further investigated the role of endogenous Gal-3 in a murine model of ovalbumin (OVA)-induced allergic conjunctivitis (AC).

Methods Conjunctival impression cytology specimens from control and patients with severe vernal keratoconjunctivitis, treated or untreated, were used to evaluate Gal-3 expression by immunocytochemistry. To investigate the mechanism of action of Gal-3, OVA-immunised BALB/c male wild-type (WT) and Gal-3 null (Gal-3$^{-/-}$) mice were challenged with eye drops containing OVA on days 14–16 with a subset of animals pretreated with 0.03% tacrolimus (TC) or dexamethasone (Dex).

Results Patients with AC and OVA-sensitised WT mice exhibited increased levels of Gal-3 in the conjunctiva compared with control, an effect reverted by the action of Dex and TC therapy. Twenty-four hours after the final OVA challenge, total and anti-OVA IgE levels increased significantly in the blood of OVA-sensitised WT and Gal-3$^{-/-}$ mice compared with controls, supporting the efficacy of the AC model. The lack of endogenous Gal-3 exacerbated the local inflammatory response, increasing the influx of eosinophils and mast cell activation. Additionally, OVA-sensitised Gal-3$^{-/-}$ animals exhibited increased CD4^{+} expression in the eyes as well as eotaxin, IL-4, IL-13 and interferon-γ levels in the tear fluid compared with WT animals.

Conclusion Gal-3 contributes to the pathogenesis of ocular allergy and represents a relevant therapeutic target.

INTRODUCTION

Galectins share a highly conserved carbohydrate-recognition domain (CRD) that is responsible for their high affinity for β-galactosides in glycoconjugates.[1] In mammals, 15 members of this protein family have been cloned, and based on their structural organisation classified into three subfamilies: proto, chimaera and tandem repeat types. Prototype galectins (−1, −2, −5, −7, −10, −11, −13, −14 and −15) are composed of a single CRD that is able to dimerise. Galectin-3 (Gal-3) is the only galectin classified as a chimaera-type that consists of one C-terminal CRD linked to an N-terminal domain. The third subfamily consists of tandem-repeat galectins (−4, −6, −8, −9 and −12) with two distinct CRDs connected by a flexible peptide linker.

The endogenous expression of Gal-3 protein (also called MAC-2 or L-34) has been observed in several cell types, especially those related to the inflammatory response, such as neutrophils, mast cells, macrophages, lymphocytes and eosinophils.[2–5] Among the various roles described for Gal-3, the most relevant are those related to the inflammatory response, tumourigenesis, innate and acquired immunity.[6 7] In inflammatory processes, Gal-3 has been described as a proinflammatory mediator via the activation of mast cells and basophils, regulation of leucocyte recruitment and monocyte/macrophage cytokine release, chemotaxis and phagocytosis.[8–14] Despite the proinflammatory roles of Gal-3 in the Th1-driven inflammatory response, its role in allergies, which are Th2-driven, is controversial. In experimental models of ovalbumin (OVA)-induced atopic dermatitis[15] and asthma,[4 13] Gal-3 null mice presented an attenuated inflammatory response characterised by decreased influx of eosinophils, mononuclear cells and lymphocytes in target organs (skin, lung and bronchoalveolar lavage) compared with wild-type (WT) animals. Furthermore, Gal-3 null mice showed a shift in the Th2 response towards Th1 in the asthma model via decrease IL-5 and IL-13 cytokine levels, but not interferon-γ (IFN- γ), IL-2 and IL-4.[4]

Conversely, a protective effect of Gal-3 was described in a murine model of OVA-induced asthma using gene therapy.[16–18] Mice treated with a plasmid encoding Gal-3 (pGal-3) increased Gal-3 protein expression in the lungs and presented a decreased influx of eosinophils and lymphocytes in the bronchoalveolar lavage as well as diminished fibrosis and IL-5 and IL-10 levels compared with non-treated animals.[16 17] Additionally, OVA-challenged mice exhibited higher mRNA expression of so-called suppressor of cytokine signalling (SOCS-1 and SOCS-3) proteins and IL-17 in the lungs than was seen in the pGal-3 mice.[18] These results suggest that Gal-3 treatment could be a good therapeutic target in allergic diseases.

Given that molecular mechanisms by which Gal-3 modulates cellular responses in allergy are not yet fully determined, we evaluated this protein as a possible biomarker in vernal keratoconjunctivitis (VKC), a chronic allergic inflammation of ocular surface.[19] Furthermore, we investigated the role of endogenous Gal-3 in a murine model of IgE-mediated allergic conjunctivitis (AC). This study sheds light on the genesis of ocular allergic disorders and may lead to new therapies for the treatment of these diseases.

Br J Ophthalmol: first published as 10.1136/bjophthalmol-2017-311473 on 3 March 2018. Downloaded from http://bjo.bmj.com/ on 2 August 2018 by guest. Protected by copyright.

APÊNDICE B – Lack of endogenous Annexin A1 increases mast cell activation and exacerbates experimental Atopic Dermatitis

cells

MDPI

Article

Lack of Endogenous Annexin A1 Increases Mast Cell Activation and Exacerbates Experimental Atopic Dermatitis

Jéssica dos Santos Parisi [1], Mab Pereira Corrêa [2] and Cristiane Damas Gil [1,2,*]

[1] Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo 04023-900, Brazil; parisijessica@live.com

[2] Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto 15054-000, Brazil; mabiiic@gmail.com

* Correspondence: cristiane.gil@unifesp.br; Tel.: +55-011-5576-4268

Received: 28 November 2018; Accepted: 3 January 2019; Published: 15 January 2019

Abstract: Annexin A1 (AnxA1) is a protein with potent anti-inflammatory actions and an interesting target that has been poorly explored in skin inflammation. This work evaluated the lack of endogenous AnxA1 in the progression of ovalbumin (OVA)-induced atopic dermatitis (AD)-like skin lesions. OVA/Alum-immunized C57BL/6 male wild-type (WT) and AnxA1 null ($AnxA1^{-/-}$) mice were challenged with drops containing OVA on days 11, 14–18 and 21–24. The $AnxA1^{-/-}$ AD group exhibited skin with intense erythema, erosion and dryness associated with increased skin thickness compared to the AD WT group. The lack of endogenous AnxA1 also increased IgE relative to WT animals, demonstrating exacerbation of the allergic response. Histological analysis revealed intense eosinophilia and mast-cell activation in AD animals, especially in $AnxA1^{-/-}$. Both AD groups increased skin interleukin (IL)-13 levels, while IL-17A was upregulated in $AnxA1^{-/-}$ lymph nodes and mast cells. High levels of phosphorylated ERK were detected in keratinocytes from AD groups. However, phospho-ERK levels were higher in the $AnxA1^{-/-}$ when compared to the respective control groups. Our results suggest AnxA1 as an important therapeutic target for inflammatory skin diseases.

Keywords: inflammation; mast cell; eosinophil; ERK; immunohistochemistry; skin

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD), also known as atopic eczema, is the most common chronic inflammation of skin is characterized by itchy, red, wet and cracked skin [1,2]. AD etiology is multifactorial, and there is evidence that genetic predisposition and family history of atopic disease influences the AD onset. AD pathogenesis is attributed to imbalances in the adaptive immune system, including dysfunction of T helper (Th) lymphocytes and increased production of IgE [1–4]. Cytokines and chemokines, such as interleukin IL-4, IL-5, IL-13, eotaxins, chemokines CCL17, CCL18 and CCL22, produced by Th2 cells and dendritic cells stimulate infiltration of mast cells and eosinophils into skin [1–3]. Th2 and Th17 lymphocytes predominate in patients with AD, but Th1 cells also contribute to its pathogenesis. Th2 and Th17 cells (IL-4/IL-13 and IL-17/IL-22, respectively) produce cytokines that inhibit terminal differentiation of epidermis and contribute to the rupture of the epithelial barrier in AD patients [1,2,4]. In addition, cellular responses triggered during the allergic reaction are controlled by different signaling pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which contribute to leukocyte recruitment, mast cell activation, production of proinflammatory cytokines and differentiation of Th2 and Th17 lymphocytes [5,6].

In this scenario, we highlight annexin A1 (AnxA1) as an interesting therapeutic target for skin inflammation. AnxA1 is capable of mimicking the anti-inflammatory action of glucocorticoids by

APÊNDICE C – Bellis perennis extract mitigates UVA-induced keratinocyte damage: Photoprotective and immunomodulatory effects

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 221 (2021) 112247

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Bellis perennis extract mitigates UVA-induced keratinocyte damage: Photoprotective and immunomodulatory effects

Vivian Maria Souza de Carvalho [a], Joyce L. Covre [a], Rebeca D. Correia-Silva [a], Izabella Lice [a], Mab P. Corrêa [b], Andréia M. Leopoldino [c], Cristiane D. Gil [a,b,*]

[a] Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina, Departamento de Morfologia e Genética, São Paulo, SP, Brazil
[b] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biociências, São José do Rio Preto, SP, Brazil
[c] Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cleaved caspase-3
HaCaT
IL-6
ROS
UVA
Antioxidant defense

ABSTRACT

A need exists for further research elucidating the benefits of environmentally safe photoprotective agents against ultraviolet (UV) exposure, and plant extracts represent a human-friendly alternative formulation. This study was designed to evaluate the potential use of *Bellis perennis* extract (BPE), from the Asteraceae family, known as the common daisy or the English daisy, in cosmeceuticals as a photoprotective factor, using an *in vitro* model of UVA-induced keratinocyte damage. Human skin keratinocytes (HaCaT cell line) were incubated with BPE at 0.01, 0.1, or 1% in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), and after 15 min they were submitted to UVA radiation at 5, 10, and 15 J/cm^2 doses, respectively. For comparative purposes, *Polypodium leucotomos* extract (PLE), known as the fern, was used as a positive control in assessing the photoprotective effect. After 24 h of UVA exposure, cell viability (MTT and LDH assays), levels of cleaved caspase-3, cyclooxygenase-2, IL-6, reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzyme (catalase, SOD, and glutathione peroxidase) activity were determined. UVA radiation at 5, 10, and 15 J/cm^2 doses reduced cell viability to 63%, 43%, and 23%, respectively; we selected 10 J/cm^2 for our purposes. After 24 h of UVA exposure, treatment with 1% BPE and 1% PLE significantly recovered cell viability ($p < 0.05$). Furthermore, treatment was associated with lower cleaved caspase-3 and ROS levels, higher catalase activity, and lower IL-6 levels in the treated UVA keratinocytes compared with the untreated UVA group ($p < 0.01$). Our results demonstrate photoprotective and immunomodulatory effects of BPE in skin keratinocytes and support its use as a bioactive agent in cosmetic formulations to prevent skin damage caused by exposure to the UV light.

1. Introduction

According to data from the National Cancer Institute (INCA, Brazil), 177,000 new cases of non-melanoma skin cancer are expected in Brazil for the 2020–2022 period, followed by breast and prostate cancer (66,000 each), colorectal cancer (41,000), lung cancer (30,000) and stomach cancer (21,000). This number represents 27.1% of all cases of malignant tumors registered in the country in men and 29.5% in women. For melanoma skin cancer, which is the most severe and aggressive form of skin cancer due to its metastatic potential, an estimated 4200 cases in men and 4250 cases in women correspond with 3% of the malignant organ neoplasms diagnosed [1].

Several factors, such as a family history of skin cancer and prolonged exposure to the sun or sunbed tanning, contribute to the risks of developing skin cancer. Although major health organizations encourage the use of sunscreen and other protection strategies to minimize skin damage caused by ultraviolet (UV) radiation, the high prevalence of skin cancer in the population demonstrates the importance of public policies aimed at raising awareness of early diagnosis and photoprotection as keys to successful treatment and prevention of skin cancer [2,3].

UV radiation is divided into UVA (315-400 nm), UVB (280–315 nm) and UVC (100–280 nm) [4]. Although UVA radiation penetrates more

* Corresponding author at: Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 740, Ed. Lemos Torres – 3° andar, 04023-900 São Paulo, São Paulo, Brazil.
E-mail address: cristiane.gil@unifesp.br (C.D. Gil).

https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112247
Received 8 April 2021; Received in revised form 23 May 2021; Accepted 18 June 2021
Available online 19 June 2021
1011-1344/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO A – Comitê de Ética FAMERP

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSE DO RIO PRETO- FAMERP - SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PAPEL DAS GALECTINAS-1, -3 E -9 EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS DA PELE

Pesquisador: MAB PEREIRA CORREA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65609417.4.3001.5415

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.225.518

Apresentação do Projeto:

As respostas imunes que envolvem as inflamações crônicas da pele, tais como psoríase e dermatite, são complexas e evidenciam o desafio no diagnóstico clínico, sendo fundamental o estudo de biomarcadores para melhor definição dessas patologias o que contribuirá para uma terapia mais personalizada. Nesse contexto, destacamos as galectinas, proteínas caracterizadas por uma sequência conservada de 135 aminoácidos no domínio reconhecedor de carboidrato (CRD) responsável pela afinidade à ligação com açúcares -galactosídeos. Nas inflamações da pele, o papel das galectinas-1, -3 e -9 tem sido mostrado nas dermatites e psoríase, podendo atuar com papel pró ou anti-inflamatório. Assim, avaliaremos o padrão de expressão das galectinas-1, -3 e -9 e sua relação com as células inflamatórias na psoríase, dermatite atópica e dermatite de contato alérgica. Além disso, avaliaremos in vitro o efeito da administração das galectinas recombinantes na produção de citocinas pelos queratinócitos, linhagem HaCaT, estimulados por TNF-/IFN-. Serão utilizadas biópsias de pele com psoríase, dermatite de contato alérgica e dermatite atópica (n = 10 para cada). Para o grupo controle, utilizaremos biópsias de margens de pele clinicamente normais removidas junto com tumores de pele (n=10). Os estudos serão realizados por meio da quantificação de células inflamatórias, imunohistoquímica para detectar a expressão das galectinas e, imunofluorescência para co-

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br

localização das galectinas e células inflamatórias. Para os estudos in vitro, queratinócitos da linhagem HaCaT serão pré-tratados com as galectinas nas concentrações de 0, 0.4 ou 4 g/mL e após 30 minutos, ativadas por TNF-alfa/IFN-gama ou apenas meio de cultura (Controle). Serão realizados ensaios de viabilidade celular, western blotting para detecção das quinases ativadas por mitógenos e ensaio multiplex para detecção de citocinas e quimiocinas. Os resultados contribuirão para o melhor entendimento das ações biológicas e mecanismos moleculares das galectinas nas inflamações crônicas da pele.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliar o padrão de expressão das galectinas-1, -3 e -9 e sua relação com as células inflamatórias na psoríase, dermatite atópica e dermatite de contato alérgica. Além disso, avaliar in vitro o efeito da administração das galectinas exógenas na produção de citocinas pelos queratinócitos, linhagem HaCaT, estimulados por TNF-/IFN-.

3.2. Objetivos Específicos

Nos estudos in vivo, avaliaremos nas biópsias de DA, DCA e Psa:

3.2.1. A resposta inflamatória por meio da quantificação de mastócitos, eosinófilos e células de Langerhans;

3.2.2. Padrão de expressão das Gal-1, -3 e -9 na epiderme e derme;

3.2.3. Co-localização da expressão das Gal-1, -3 e -9 e células inflamatórias.

Nos estudos in vitro com os queratinócitos humanos, linhagem HaCaT, avaliaremos:

3.2.4. Viabilidade celular para os diferentes tratamentos/estímulos que serão utilizados;

3.2.5. Efeito das galectinas sobre a produção de citocinas após estímulo com TNF-/IFN-;

3.2.6. Efeito das galectinas na expressão das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Nesse estudo utilizaremos biópsias de pele já coletadas e incluídas em parafina que constituem o arquivo de blocos do Laboratório de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto/SP. Além disso, realizaremos estudos in vitro, com células da linhagem HaCaT, comercialmente disponíveis. Assim, o referido estudo não apresentará riscos à saúde do paciente.

Benefícios:

Considerando os papeis reguladores e a modulação da expressão das galectinas nos diferentes processos inflamatórios da pele, a análise comparativa da expressão dessas proteínas em biópsias de pele com psoríase, dermatite atópica e dermatite de contato alérgica poderá auxiliar no diagnóstico diferencial dessas patologias. Além disso, a investigação dos efeitos exógenos das galectinas sobre os queratinócitos estimulados pelas citocinas TNF-/IFN-y in vitro, contribuirão para melhor entendimento de suas ações biológicas emecanismos moleculares na pele.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo coparticipante apresentado pela pesquisadora que será desenvolvido em departamento da FAMERP;

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Assinaturas pertinentes da instituição participante.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto CoParticipante aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto CoParticipante aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_874201.pdf	20/06/2017 10:00:15		Aceito
Outros	pesquisadorresponsavel.pdf	20/06/2017 09:41:06	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_874201.pdf	24/05/2017 11:48:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_revisado.pdf	24/05/2017 11:48:18	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Outros	Respostaaspendencias2017CEP.pdf	24/05/2017 11:44:48	MAB PEREIRA CORREA	Aceito

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_874201.pdf	10/03/2017 15:35:58		Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	10/03/2017 12:22:07	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/03/2017 12:21:56	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE.pdf	09/03/2017 12:03:58	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/03/2017 10:33:58	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisadores.pdf	07/03/2017 12:06:52	MAB PEREIRA CORREA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 17 de Agosto de 2017

Assinado por:
GERARDO MARIA DE ARAUJO FILHO
(Coordenador)

ANEXO B – Comitê de Ética UNESP

UNESP - INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PAPEL DAS GALECTINAS-1, -3 E -9 EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS DA PELE

Pesquisador: MAB PEREIRA CORREA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 65609417.4.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.153.076

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora atende à pendência, que solicitou "uma autorização assinada pelo(a) responsável pelo Laboratório onde encontram-se as amostras do material biológico que serão utilizadas."

Objetivo da Pesquisa:

Atendimento de pendência

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora apresenta o documento solicitado pelo CEP, onde consta a autorização da responsável pelo arquivo de biopsias de pele.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Avaliados na submissão anterior.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência atendida.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação da ultima reunião do CEP, a aprovação do projeto aguardava apenas a

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2545 **Fax:** (17)3221-2500 **E-mail:** silvia@ibilce.unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS

Continuação do Parecer: 2.153.076

documentação referente à autorização do responsável do local de onde serão utilizados o material biológico. Com o anexo confirmado o projeto está aprovado por unanimidade. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados semestralmente, contando a partir desta data.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_874201.pdf	20/06/2017 10:00:15		Aceito
Outros	pesquisadorresponsavel.pdf	20/06/2017 09:41:06	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_revisado.pdf	24/05/2017 11:48:18	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Outros	Respostaaspendencias2017CEP.pdf	24/05/2017 11:44:48	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	10/03/2017 12:22:07	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE.pdf	09/03/2017 12:03:58	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/03/2017 10:33:58	MAB PEREIRA CORREA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisadores.pdf	07/03/2017 12:06:52	MAB PEREIRA CORREA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 03 de Julho de 2017

Assinado por:
Monica Abrantes Galindo de Oliveira
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2545 **Fax:** (17)3221-2500 **E-mail:** silvia@ibilce.unesp.br

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

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

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

São José do Rio Preto, 23/09/2021

_____

Assinatura do autor