



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – ICF

IARA GONÇALVES DE MOURA

MACEIÓ-AL

2021

IARA GONÇALVES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
GALECTINA-1: UMA REVISÃO DE LITERATURA.**

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Eliane Aparecida Campesatto.

MACEIÓ-AL

2021

**Catálogo na fonte Universidade
Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

M929a Moura, Iara Gonçalves de.

Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da galectina-1 : uma
revisão de literatura / Iara Gonçalves de Moura. – 2021.
93 f. : il. color.

Orientadora: Eliane Aparecida Campesatto.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 83-93.

1. Inflamação. 2. Nociceptividade. 3. Galectina 1. I. Título.

CDU: 615.276

Dedico este trabalho aos meus pais, a quem devo tudo que sou. E a Laís, minha irmã e melhor amiga, nosso amor é pra sempre.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar expresso gratidão à Deus, meu melhor amigo e meu protetor, sem Ele nada disso seria possível e, portanto, dedico toda honra, glória e louvor ao meu criador. Em segundo lugar, agradeço aos meus pais, Josefa e Laelson, por toda força e cuidado comigo, por não medirem esforços pra que eu pudesse chegar até aqui, se não fosse pelo apoio de vocês o caminho teria sido bem mais difícil; obrigado por me levantarem todas as vezes que caí e por acreditarem em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, amarei vocês em todo o tempo.

À minha irmã, Laís, minha sorte e certeza, não existem palavras que possam expressar meu amor por você. Não consigo agradecer por tudo que és, representa e pelo que viveu comigo em todos os anos juntas, e por tantos outros que virão. Obrigada por tanto, somos eu e você pra sempre. Agradeço ao meu namorado, Rubens, por todo amor, cuidado, paciência e segurança que me passa constantemente, que sempre me apoiou totalmente até chegar nesse resultado, por acreditar no meu objetivo e me incentivar até que fosse concluído, você é meu porto seguro, obrigado por dividir os dias, alegrias e tristezas comigo; amo você, quero compartilhar mais e mais dias contigo; juntos vamos bem. À minha tia Lindalva, minha segunda mãe, obrigado por todos os conselhos e por cuidar tão bem de mim e da Laís, um dia espero ser metade do ser humano que és, nos inspiramos em você e te amamos.

Agradeço às minhas amigas, Gerlane, Jocielma, Laís Regina e Sarah. Obrigada pelo carinho e paciência comigo, sei que as vezes posso irritar vocês com meus dramas, mas mesmo assim permanecemos lado a lado, acredito fielmente que nossas almas se encontraram e assim permanecem. À Juliana e Taiane, nunca imaginei que faria amigas tão bonitas na UFAL, ainda bem que não foi como esperava; que nosso carinho se fortaleça mesmo após a graduação, levo vocês em meu coração. Cícero, Gabriella, Joyanne e Pedro, nem consigo colocar aqui todos os perrengues que passamos juntos, obrigado por dividirem comigo nossas lamentações na janela do ICF e deixarem tudo mais leve.

À minha orientadora, prof^a. Dr^a. Eliane Aparecida Campesatto, por me acolher na iniciação científica no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) e nos projetos de extensão, através do programa de monitoria e GFADOC, por todas as

oportunidades oferecidas e conhecimento compartilhado, através da sua orientação pude ampliar os estudos sobre Farmacologia e amar essa ciência. Agradeço também ao meu grupo de pesquisa GFADOC pelas experiências trocadas entre meus colegas, facilitando o processo de aprendizado sobre doenças crônicas e, nesse último ano, por todo o trabalho desenvolvido frente à pandemia a respeito do COVID-19, pela parceria e união durante todo o tempo que compartilhamos na instituição.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pelo acolhimento desde o primeiro dia que iniciei na jornada acadêmica, por tantas oportunidades de aprendizado e evolução que me foram apresentadas, tornando-se em tantos momentos minha segunda casa. Agradeço por todos os profissionais que fazem parte da instituição, especialmente os que compõem o ICF, pelo cuidado, paciência e dedicação com todos os alunos.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à Lola, minha princesa, você nem sabe, mas me salvou em tantos dias, mesmo nos mais difíceis, seja tirando sorrisos e gargalhas com lambeijos e brincadeiras, ou apenas deitando do meu lado enquanto estudava. Agradeço por trazer mais luz pra minha vida, amo você, bebê.

“I wanna be defined by the things that I love, not the things I hate, not the things I’m afraid of, not the things that haunt me in the middle of the night. I just think that you are what you love”. (Taylor Swift)

RESUMO

A dor e inflamação são as principais causas do consumo de medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios, essa farmacoterapia possui diversos efeitos colaterais, entre eles, problemas gastrointestinais e cardíacos. Dessa maneira, se torna necessário o estudo de novas terapias alternativas que forneçam maior porcentagem de segurança aos pacientes. As Galectinas são proteínas da família das Lectinas, expressas em tecidos normais e patológicos. Sendo considerada uma molécula multifuncional, participando de diversos processos biológicos, entre eles controle de sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, apoptose, gênese de tumores, interações patógeno-hospedeiro e homeostase de células T. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da Galectina-1 através de revisão bibliográfica de estudos *in vitro* e *in vivo*. A revisão foi elaborada a partir de artigos encontrados nos seguintes bancos de dados: *ScienceDirect*, *PubMed*, Google acadêmico, periódicos CAPES e *Scientific electronic library online* (SCIELO), publicados no período de 2012 a 2019, com restrições de idioma para português e inglês. A partir da análise feita foi possível observar que Gal-1 apresenta resultados promissores em camundongos com Doença de Parkinson, através da diminuição na ativação da micróglia; em animais com inflamação crônica no fígado por contagem de células, análise da expressão gênica pelo RNA e proteínas, apresentando as consequências da perda de Gal-1 no curso da inflamação; em camundongos com Infarto agudo do Miocárdio e Insuficiência cardíaca foram apresentados efeitos positivos nos cardiomiócitos submetidos à hipóxia e na limitação da inflamação do Miocárdio; as células dendríticas combinadas com Gal-1 e linfócitos apoptóticos também foram analisadas usando um modelo de aloenxerto no fígado, sendo possível concluir que a transfusão de DCGal-1-AL diminuiu os riscos de rejeição no transplante de fígado; no estudo realizado utilizando modelo experimental de conjuntivite alérgica verificou-se que os ratos com tratamento combinado de Gal-1 obtiveram diminuição de proteínas inflamatórias, e consequentemente, controle da resposta inflamatória.

Palavras-chave: Inflamação. Nocicepção. Galectina.

ABSTRACT

Pain and inflammation are the main causes of the consumption of analgesic and anti-inflammatory drugs, this pharmacotherapy has several side effects, between them, gastrointestinal and cardiac problems. That way, becomes necessary to study new alternative therapies that provide a higher percentage of safety for patients. Galectins are proteins of the Lectin family, expressed in normal and pathological tissues. Being considered a multifunctional molecule, participating in several biological processes, including control of cell signaling, proliferation and cell cycles, apoptosis, tumor genesis, pathogen-host interactions and T-cell homeostasis. The presente study had as objective to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of Galectin-1 through a literature review of in vitro and in vivo studies. The review was elaborated from articles found in the following databases: ScienceDirect, PubMed, Google Scholar, CAPES journals and Scientific electronic library online (SCIELO), published in the period from 2012 to 2019. From the analysis made it was possible to observe that the Gal-1 shows promising results in mice with Parkinson's disease, by decreasing microglia activation; in animals with chronic inflammation in the liver evaluated by cell count, analysis of gene expression by RNA and proteins, presenting the consequences of the loss of Gal-1 in the course of inflammation; in mice with acute myocardial infarction and cardiac insufficiency, positive effects were shown in cardiomyocytes subjected to hypoxia and in the limitation of myocardial inflammation; dendritic cells combined with Gal-1 and apoptotic lymphocytes were also analyzed using an allograft model in the liver, and it is possible to conclude that the transfusion of DCGal-1-AL decreased the risk of rejection in liver transplantation; in the study carried out using an experimental model of allergic conjunctivitis it was found that the rats with combined treatment of Gal-1 obtained a decrease in inflammatory proteins, and consequently, control of the inflammatory response.

Keywords: Inflammation. Nociception. Galectin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquematização sobre a classificação da dor.	22
Figura 2: Quatro características do sistema de transdução de sinais.	25
Figura 3: Via ascendente da nocicepção - primeira conexão	28
Figura 4: Via ascendente da nocicepção - segunda conexão.	29
Figura 5: Representação da estrutura das lectinas quanto sua classificação.	40
Figura 6: Estrutura da galectina-1.	41
Figura 7: Galectina-1 quebra o ciclo vicioso e protege os neurônios dopaminérgicos do dano secundário causado pela ativação crônica da micróglia.....	53
Figura 8: Análise de sangue caracterizando aumento de reações ductobiliares e lesão de hepatócitos no fígado de dKO de acordo com a idade	56
Figura 9: Aumento da inflamação e proliferação de células hepáticas em fígados dKO / B6 vs. Mdr2-KO / B6	57
Figura 10: Aumento da gravidade da colangiopatia em fígados dKO/B6 vs. Mdr2-KO/B6 em idade jovem.	58
Figura 11: RT-qPCR, Imunocoloração, coloração Tricrômica, IHC e expressão de Opn	59
Figura 12: Representação esquemática das consequências de Perda de Gal1 no curso de CLI em ratos Mdr2-KO.....	61
Figura 13: Regulação da expressão de Gal-1 no coração de camundongo após IAM e no tecido cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca crônica em estágio terminal	63
Figura 14: Representante micrografias confocais a laser de coração tecido de camundongos Lgals-1 / ou WT 7 dias após AMI ou cirurgia simulada, com quantificação de células números.	65
Figura 15: Contagem de células e representação de micróglia.....	66
Figura 16: Proliferação de células T.....	69
Figura 17: Representação de Curvas de Kaplan-Meier e níveis de função hepática com alterações histopatológicas	71
Figura 18: Pontuação clínica para CA e representação de olhos de ratos observados 20 min após a administração de C48/80 ou PBS.	76

Figura 19: Efeito do colírio Gal-1 na desgranulação dos mastócitos e liberação de histamina.....	77
Figura 20: Representação da coloração hematoxilina-eosina nos grupos de animais.	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: A regulação positiva do nível de proteína COX2 e iNOS induzido por LPS. (a): análise de western blot para Cox2 e iNOS; (b-c): análise estatística; (d-e): A regulação positiva do nível de mRNA de TNF- α e IL-1 β induzido por LPS foi revertida por rhGal-1	46
Gráfico 2: Ensaio de viabilidade celular com MTT. Os resultados mostram que rhGal-1 protegeu as células do processo inflamatório induzido por LPS.	47
Gráfico 3: Teste rotatório e de polo para avaliar a função motora de camundongos com DP.....	48
Gráfico 4: Análise quantitativa dos neurônios TH-positivos no mesencéfalo.	49
Gráfico 5: DA e seus metabólitos DOPAC e HVA no corpo estriado avaliados por HPLC.....	49
Gráfico 6: Análise estatística de Western blot para detectar translocação nuclear de p65.	50
Gráfico 7: Análise estatística de Western blot para detectar a translocação nuclear de p65. (a): Western blot representativo de p65 para proteínas extraídas do núcleo ou citoplasma; (b-c-d): Análise estatística para o nível de proteína pP38, pJNK, pERK1 /2.	51
Gráfico 8: Regulação da expressão Gal-1 e função em cardiomiócitos. (A): Análise de imunoblot da expressão de Gal-1 em lisados celulares totais de cardiomiócitos HL-1 expostos a hipóxia ou normóxia condições. (B): RT-qPCR análise da expressão de mRNA de Gal-1 em células HL-1.	64
Gráfico 9: O tratamento com Gal-1 atenua o dano cardíaco em IAM reperfundido em camundongos. Diamêtro sistólico final do VE (LVESD).	67
Gráfico 10: Gráficos de células do baço. (A): Análise estatística de células do baço 7 dias após transplante. (B): Análise estatística de detecção de infiltração de células T CD8 ⁺	72
Gráfico 11: Níveis de IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10 em homogenatos de olhos.....	79
Gráfico 12: Efeito do colírio Gal-1 nos níveis de MAPK no olho homogenatos.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos receptores quanto sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução, e suas respectivas características.	27
Tabela 2: Principais proteínas séricas e suas funções biológicas.	33
Tabela 4: Tabela descrevendo as diferenças genéticas encontradas em Mdr2-KO da cepa FVB e Mdr2-KO da cepa B6.	54
Tabela 3: Conjuntivite experimental induzida em ratos e respectivo tratamento.	75

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AIEs	Anti-inflamatórios esteróides
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteróides
AL	Linfócitos apopticos
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AP-1	Proteína-1 ativada
CA	Conjuntivite alérgica
CFSE	Carboxifluoresceína
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLI	Inflamação crônica do fígado
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CRD	Domínio reconhecedor de carboidratos
CRH	Fator liberador de Corticotrofina
DA	Dopamina
DCs	Células dendríticas
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FBS	Soro fetal bovino
FCM	Citometria de fluxo
FMCD	Fármacos modificadores do curso da doença
Gal-1	Galectina-1
GCs	Glicocorticóides
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

HVA	Ácido Homovanílico
i.p.	Injeções intraperitoneais
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IASP	Associação de Estudos Internacionais da Dor
IC	Insuficiência cardíaca
IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase
JNK	c-Jun N- quinase terminal
L-DOPA	Levodopa
Lgals-1	Gene que codifica galectina-1
LPS	Lipopolissacarídeo
LVESD	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
LVFS	Encurtamento fracionário do ventrículo esquerdo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MIP1a	Proteína inflamatória de macrófagos 1a
MLR	Reação mista linfocitária
MPTP	Precursor da neurotoxina MPP ⁺
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
Opn	Osteopontina
PBS	Tampão fosfato-salino
PG	Prostaglandinas
PGD ²	Prostaglandina do tipo D ²
PGE ²	Prostaglandina do tipo E ²
PGF ²	Prostaglandina do tipo F ²
PGI ²	Prostaglandina do tipo I ²
PLA ²	Fosfolipase A ²
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
rhGal-1	Galectina-1 recombinante
RGC	Receptores proteicos específicos

RTKs	Tirosinas quinases receptoras de membrana
SAA	Amiloide sérico A
SAP	Amiloide sérico P
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TGF	Fator transformador de crescimento
TH	Tirosina Hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Tol-DCs	Células dendríticas tolerogênicas
Treg	Células T reguladoras
TXA ²	Tromboxano do tipo A ²
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 DOR E NOCICEPÇÃO	21
2.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA DOR	22
2.1.1.1 CLASSIFICAÇÃO QUANTO AOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS	22
2.1.1.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO TEMPO DE DURAÇÃO	23
2.1.2 FISIOLOGIA DA DOR	24
2.2 INFLAMAÇÃO	30
2.2.1 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA E ADAPTATIVA	30
2.2.2 REAÇÃO INFLAMATÓRIA SISTÊMICA	32
2.2.3 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO	34
2.2.4 TERAPIA FARMACOLÓGICA	36
2.3 GALECTINA-1	39
3. OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL:.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	43
4. METODOLOGIA.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1 GALECTINA-1 ATENUA A NEURODEGENERAÇÃO NO MODELO DA DOENÇA DE PARKISON AO MODULAR O EIXO MICROGLIAL MAPK/ IκB/ NFκB ATRAVÉS DE SEU RECONHECIMENTO DO DOMÍNIO DE CARBOIDRATOS	45
5.2 FALTA DE GALECTINA-1 EXARCEBA HEPATITE CRÔNICA NO FÍGADO, FIBROSE E CANCINOGENESE EM HEPATÓCITOS MURINOS NO MODELO DE CARCINOMA	53
5.3 GALECTINA-1 CONTROLA A INFLAMAÇÃO E REMODELAÇÃO VENTRICULAR DURANTE O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	61

5.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÊNICAS INDUZIDAS POR GALECTINA-1 E COMBINADAS COM LINFÓCITOS APOPTÓTICOS PROLONGAM A SOBREVIVÊNCIA DO ALOENXERTO NO FÍGADO	67
5.5 TRATAMENTO COM COLÍRIO DE GALECTINA-1 REGULA A DEGRANULAÇÃO DOS MATÓCITOS E ATENUA A GRAVIDADE DA CONJUTIVITE.....	74
6. DISCUSSÃO	Error! Bookmark not defined.
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
8. REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

Definida como uma experiência multissensorial desagradável, a dor envolve não só um componente sensorial, mas também um componente emocional, que é associada a uma lesão tecidual concreta ou potencial, ou descrita em função dessa lesão. Possuindo grande importância para a integridade física do indivíduo, não sendo possível caracterizá-la objetivamente por não possuir marcadores biológicos para tal (OTIS; FLOR; TURK, 2013).

A dor desencadeia variações fisiopatológicas que vão contribuir para o aparecimento de alterações orgânicas e psicológicas que podem conduzir a um fenômeno doloroso permanente (VOLTARELLI, 1994). Por vezes a dor existe sem que seja possível encontrar uma lesão física que lhe dê origem ou está associada a uma lesão. A persistência da dor, mesmo após a cura da lesão, leva-nos a encarar a dor como uma doença por si só e não apenas como um sintoma, conforme reconhecido pelo Programa Nacional de Controle da Dor (EFIC) em 2018.

A inflamação pode ser definida como a reação do tecido vivo vascularizado à injúria local. Invertebrados sem sistema vascular, organismos unicelulares e parasitas pluricelulares têm suas próprias respostas aos estímulos externos danosos (VOLTARELLI, 1994).

O processo inflamatório, sob determinado ponto de vista pode ser entendido como um mecanismo de defesa do organismo e, como tal, atua destruindo (fagocitose e anticorpos), diluindo (plasma extravasado) e isolando ou sequestrando (malha de fibrina) o agente agressor, além de abrir caminho para os processos reparativos (cicatrização e regeneração) do tecido afetado. Entretanto, a inflamação pode ser potencialmente danosa, uma vez que em sua manifestação pode lesar o próprio organismo, às vezes de forma mais deletéria que o próprio agente injuriante, como ocorre por exemplo na artrite reumatoide do homem e em alguns tipos de pneumonia (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A Galectina-1 (Gal-1) faz parte da família de Lectinas e reconhecem β -galactosídeos que contém, preferencialmente, sequências de N-acetilactosaminas. Essa proteína desenvolve papéis biológicos importantes no organismo, como regulação da resposta auto-imune, aterosclerose, processos infecciosos e câncer. Isso faz da Gal-1 um alvo terapêutico atraente para limitar tais inflamações e doenças,

além de prevenir rejeição de aloenxertos e potencializar a resposta antitumoral (LIU; RABINOVICH, 2010).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo realizar pesquisa bibliográfica em artigos publicados que apresentem o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da Gal-1.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOR E NOCICEPÇÃO

De acordo com a Associação de Estudos Internacionais da Dor (IASP) “... a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou em potencial, descrita nos termos de danos reais ou potencial ao tecido”. A dor se caracteriza como um grave problema da saúde em todo mundo, no Brasil, pouco se conhece sobre a epidemiologia desse mal que afeta a população, dessa maneira, um fator importante na saúde pública (VASCONCELOS; ARAÚJO, 2018). Sendo uma das condições mais prevalentes e que limitam a qualidade de vida e produtividade, nesse contexto, quando apresentada como dor crônica ela deixa de ser um sintoma para se tornar uma doença (SALDANHA et al, 2017).

Nos EUA cerca de 89 bilhões de dólares são gastos anualmente para tratamento ou soluções paliativas relacionadas a dor, com isso cerca de 60% dos estadunidenses tornam-se parcial ou totalmente incapacitados, podendo esta condição ser permanente ou não. Adicionando a estas despesas custos diretos e indiretos por conta das perdas de produtividade, gastos com reformas antecipadas e perda de empregos (OTIS; FLOR; TURK, 2013).

Quando ocorre uma lesão tecidual o organismo aciona mecanismos fisiológicos com o objetivo de limitar o dano tecidual e auxiliar a regeneração. Esses mecanismos fazem parte de uma resposta inflamatória sendo composto por cinco sinais cardinais: dor, rubor, calor, tumor, e eventualmente, perda da função (PEREIRA, 2006). Geralmente a dor é provocada por qualquer estímulo nocivo que danifique o tecido, servindo de alerta como a função de proteção do organismo, ativando reações e induzindo comportamentos de precaução, tornando-se uma experiência complexa integrada nos centros corticolímbicos, que envolvem a transdução do estímulo nocivo e o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (LEE; NEUMEISTER, 2019).

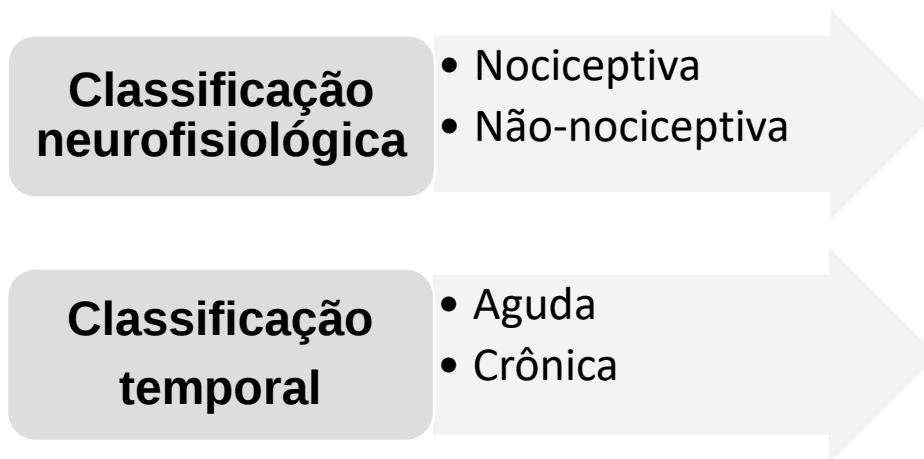
A diferenciação entre dor e nocicepção é fundamental para entender adequadamente os sistemas sensoriais envolvidos nesses fenômenos, tanto na área clínica quanto na experimental. Sendo assim, os componentes cognitivos relacionados a dor também são ativados por aferência nociceptivas. A nocicepção é a ativação fisiológica de vias neurais por estímulos (químicos, nocivo, térmico ou mecânico) que são potencialmente prejudiciais (PENHA, 2001). Essa série complexa e interativa de mecanismos é codificado como uma mensagem nociceptiva, sendo

posteriormente transmitida e processada em centros nervosos superiores (MILLAN, 1999).

2.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA DOR

Existem muitas maneiras de se classificar a dor, podendo possuir diversas causas, atingir diferentes tecidos e distinta duração de tempo. Dessa maneira, ela pode ser classificada em relação aos seus mecanismos fisiopatológicos e o tempo de duração (Figura 1). A classificação neurofisiológica da dor é baseada nos seus mecanismos desencadeantes, e estas podem ser diferenciadas em dor nociceptiva e não nociceptiva (VASCONCELOS; ARAÚJO, 2018)

Figura 1: Esquemática sobre a classificação da dor.



Fonte: Autor (2020).

2.1.1.1 CLASSIFICAÇÃO QUANTO AOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS

Nas dores nociceptivas as vias se encontram preservadas, sendo ativadas pelos nociceptores (fibras A δ e fibras C) de tecidos cutâneos (dor somática) ou profundos (dor visceral). Ela tem o papel de proteção, pois a partir do momento que ocorre o estímulo nocivo, imediatamente ela é percebida fazendo com que seja rapidamente identificada e tratada impedindo a progressão do estímulo (FONG; SCHUG, 2014). Geralmente elas são descritas da seguinte maneira:

- Dor somática: sensação dolorosa, exacerbada quando ocorre movimento e bem localizada. Por exemplo: dores ósseas, dores músculo-esqueléticas e dores articulares (OTIS; FLOR; TURK, 2013).
- Dor visceral: Ocorre quando as vísceras são a origem da dor, caracterizada como mal localizada e profunda, sendo por muitas vezes causadas por distensão ou estiramento dos órgãos. Pode ainda ser dividida como dor visceral referida e direta. Como exemplo, temos: obstrução intestinal, câncer de pâncreas ou metástase intraperitoneal (OTIS; FLOR; TURK, 2013).

Em relação a dor não nociceptiva, a mais conhecida é definida como Dor neuropática. A dor do tipo Neuropática é fruto de uma lesão ou disfunção no Sistema Nervoso Central (SNC) ou no Sistema Nervoso Periférico (SNP) com duração longa após o trauma desencadeante, podendo ser esta lesão total ou parcial, considerada um tipo de dor que deteriora profundamente a qualidade de vida do paciente. A dor neuropática possui características distintas, onde é possível distinguí-las de outros tipos de dor; se tratando de uma dor de longa duração os sintomas sensoriais são presentes após o período de regeneração, possuindo graus variáveis de sintomas sensoriais e motores (MIRANDA; JUNIOR; PELLOSO, 2016).

2.1.1.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO TEMPO DE DURAÇÃO

No método de classificação das dores em relação aos seus mecanismos fisiopatológicos é possível observar que existem diferenças nos tempos de duração de cada tipo de dor, sendo importante sua caracterização temporal, fazendo distinção entre dor aguda (curta duração) ou dor crônica (longa duração) (MILLAN, 1999).

A dor aguda possui um tempo de duração curto, tem sua origem geralmente no trauma de tecidos moles ou inflamação, estando relacionada como um processo adaptativo biológico de reparo tecidual. Ela é descrita como de início imediato, podendo ser identificada em até 0,1 segundo após o estímulo nocivo, assim sua causa é facilmente identificada. Ela é considerada até certo ponto, como um sinal de alerta e proteção do organismo, sendo um sintoma importante no diagnóstico de diversas doenças (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

A função de alerta provoca reflexos motores de retirada ou reações de fuga, interrompendo a exposição ao estímulo. Além disso, sob certas circunstâncias, a dor aguda ou o seu tratamento podem levar à ativação comportamental generalizada ou

respostas endócrinas, como por exemplo, aumento da atividade simpática e secreção de corticosterona, que se trata de um hormônio produzido pelas glândulas adrenais como resposta um estímulo estressante, responsável por orquestrar uma série de outras respostas adaptativas. (HERMAN; CULLINAN, 1997).

Por outro lado, a dor crônica possui um tempo de duração mais longo (duração igual ou superior de três a seis meses, ou quando persiste após a cura da lesão) e está associada a destruição tecidual. Sua localização não é bem definida pelo paciente e por esse motivo é de difícil identificação gerando diversos estágios patológicos (CHERUBINO et al, 2012.).

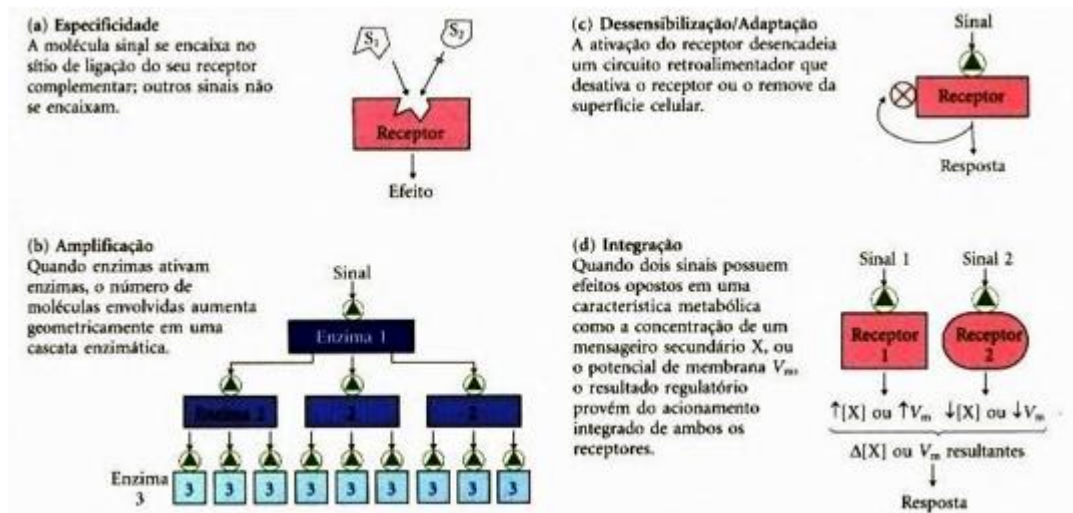
A dor crônica se trata de um problema complexo biologicamente, socialmente e psicologicamente, necessitando de uma equipe multiprofissional para elucidação de diagnóstico e tratamento. Por se tratar de uma doença debilitante ela reflete na saúde mental e física do indivíduo acabando por gerar uma diminuição na qualidade de vida do mesmo, resultando em quadros de susceptibilidade as infecções, depressão e problemas com ansiedade. Diante disso, atualmente ela se constitui como um problema de saúde pública, afetando cerca de 30% da população mundial (LICHTENWALTER et al, 2016).

2.1.2 FISILOGIA DA DOR

As células recebem constantemente informações dos seus receptores de membrana, estes podem ser estimulados por pH, pressão osmótica e presença de produtos nocivos. Esses sinais induzem respostas apropriadas de acordo com seus mecanismos de sinalização, que são altamente específicos e sensíveis (BASBAUM et al, 2009).

A especificidade da transdução de sinais ocorre quando se tem uma complementaridade entre o estímulo e a molécula receptora (Figura 2). Alguns fatores são importantes para essa junção precisa, como: alta afinidade dos receptores para as moléculas que recebem o estímulo, a cooperatividade na interação ligante – receptor e à amplificação do sinal pela cascata. Dentre esses mecanismos também ocorre a dessensibilização, quando um sinal está presente de maneira continuada gera uma diminuição no receptor (NELSON; COX, 2014).

Figura 2: Quatro características do sistema de transdução de sinais.



Fonte: Nelson; Cox, 2014.

A integração também é uma característica importante desse sistema, que gera uma resposta unificada apropriada, a partir de diversos sinais. A origem para desencadear cada sistema é diferente, porém a maneira como ocorrerá essa cascata de sinalizações é comum a todos (NELSON; COX, 2014).

O componente fisiológico da dor é definido como nocicepção, que é composto pelos processos de transdução, transmissão e modulação neural como resposta ao estímulo nocivo. O neurônio de primeira ordem originado na periferia estende-se para a medula espinhal, o de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o de terceira ordem projeta-se para a córtex cerebral (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004).

Os nociceptores são definidos como terminações nervosas livres que respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, sendo caracterizados com alto limiar para todos os estímulos, exceto os nocivos. Sua estrutura é formada por quatro regiões principais: Uma fibra nervosa chamada de axônio, que possuem nervos aferentes e eferentes, motores e autonômicos; o corpo celular localizado no gânglio da raiz dorsal (DRG) que coordena a atividade metabólica do neurônio; após receber o estímulo através dos dendritos, a transdução sensorial ocorre no terminal sináptico (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Esses receptores possuem a função de transmitir informações aos neurônios de ordem superior, atingindo o corno dorsal da substância cinzenta da medula espinhal. Essas comunicações entre os nociceptores ocorrem através de sinapses, sendo mais comumente as de liberação química, onde acontece a liberação dos neurotransmissores, porém, esse processo também pode ocorrer sendo controlado diretamente pelo potencial de membrana sináptica (TRANQUILLI, 2004).

No caso de uma lesão tecidual os nociceptores são estimulados e transferem a informação para o SNC, sendo considerado como uma cadeia. O corpo celular é uma área necessária para a manutenção de todas as outras regiões do receptor. O estímulo que causa a lesão tecidual pode ativar a região de transdução sensorial dos nociceptores; a caixa de eventos perirreceptor permite a produção de fatores que podem ativar ou modular a resposta do nociceptor durante o ferimento tecidual; quando o estímulo chega ao axônio, este conduz o potencial de ação ao terminal pré-sináptico onde é liberado os neurotransmissores (LAMONT; TRANQUILLI, 2000).

Divididos em quatro classes, os nociceptores podem ser classificados da seguinte maneira: mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos. Os mecânicos respondem a pressão intensa, enquanto os nociceptores térmicos são ativados por temperaturas intensas; os do tipo polimodais respondem a estímulos nocivos, mecânicos, térmicos e químicos; os silenciosos reagem a estímulos químicos, mediadores inflamatórios, estímulos mecânicos e térmicos somente após a ativação (MIRANDA; JÚNIOR; PELLOSO, 2016).

Os receptores presentes nos nociceptores podem ser do tipo vanilóides, que respondem ao calor e a capsaína, que respondem a estimulação tátil inócua, e receptores acoplados à proteína G (GPCR). Durante o processo de transmissão esses impulsos são conduzidos por um sistema de fibras nervosas aferentes de primeira ordem. Esses receptores são classificados em termos de estrutura, diâmetro e velocidade de condução (Tabela 1), estando localizados nas terminações de fibras nervosas, as principais podem ser do tipo A (A β ou A δ) ou do tipo C. (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Tabela 1: Classificação dos receptores quanto sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução, e suas respectivas características.

RECEPTORES	DESCRIÇÃO
Fibras A β	Diâmetro grande (maior que 10 μm), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).
Fibras A δ	Diâmetro intermediário (2 a 6 μm), mielinizadas. A velocidade de condução é intermediária, modulando a primeira fase da dor (LAMONT; TRANQUILLI, 2000).
Fibras C	Diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 μm), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta, responsáveis pela segunda dor (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Fonte: Adaptado de MESSLINGER, 1997; LAMONT e TRANQUILLI, 2000.

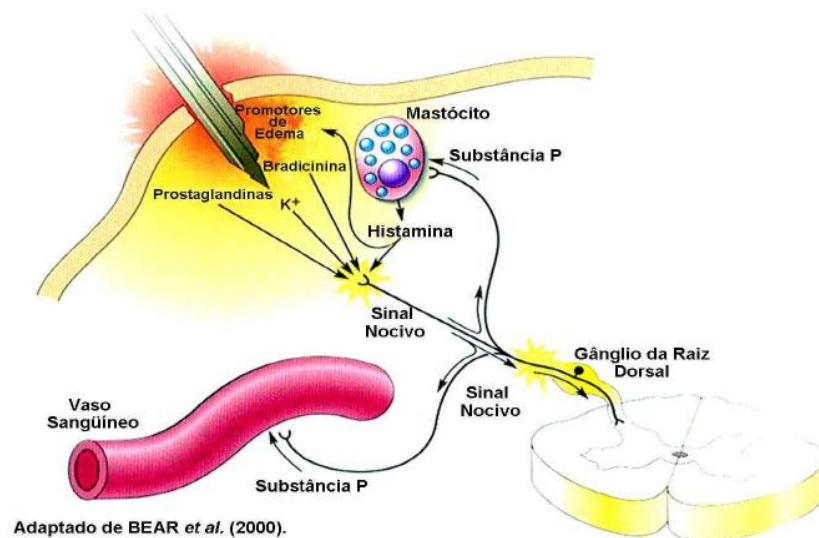
Dessa maneira, quando um dano inicial (lesão ou induzido por inflamação) ativa os nociceptores locais as fibras nervosas A δ e C ficam sensibilizadas assumindo limiares de ativação mais baixos. Estímulos que resultam em uma sensação de dor aguda ou “dor primária” refletem a ativação de fibras A δ (que conduzem a dor primária), e a nocicepção lenta e difusa pela fibra do tipo C (dor secundária). A dor visceral é a única onde não existem componentes primários e secundários (BOURNE et al, 2014).

A condução do impulso nervoso ocorre através do sistema sináptico, que realiza a sequência em cadeia entre os neurônios. Essa transmissão chega aos sistemas reticulares e límbicos do córtex cerebral gerando uma resposta sensorial através dessa decodificação, que é o que se chama de percepção da dor. Após essa etapa é iniciado o processo de modulação da dor, onde as vias descendentes do cérebro

se encontram de maneira altamente organizada e se estendem até o corno dorsal da medula espinhal (MIRANDA; JÚNIOR; PELLOSO, 2016).

A partir dessa região são acionados neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem na medula espinhal. Essa conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal da medula espinhal envolvem neurotransmissores como Glutamato e a Substância P (Figura 3), ambos responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente. Esses estímulos podem atuar como mecanismos de controle dos sinais da dor, aumentando ou diminuindo as respostas enviadas ao cérebro. O que justifica o porquê de alguns indivíduos apresentarem sinais de dores diferentes frente aos mesmos estímulos nocivos (ELLISON, 2017).

Figura 3: Via ascendente da nocicepção - primeira conexão.



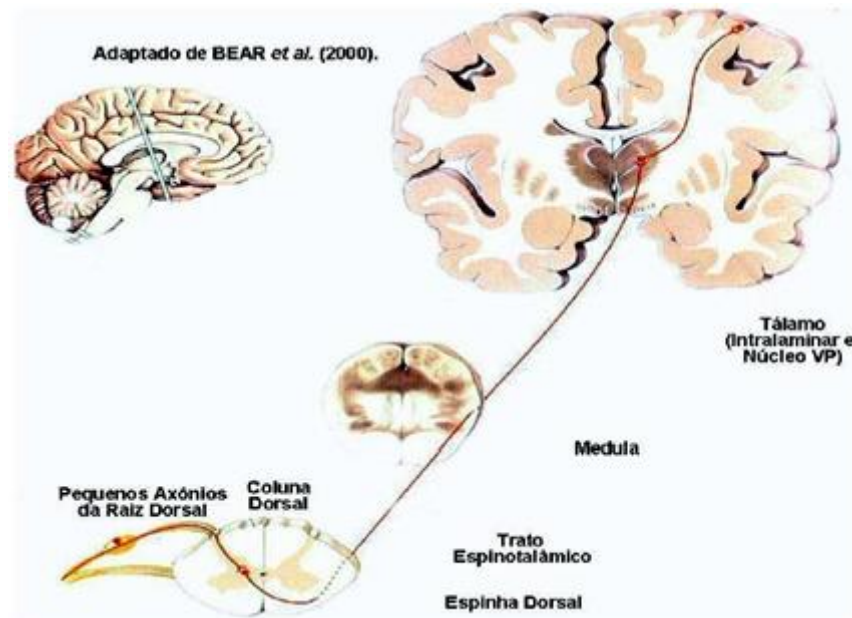
Fonte: Bear et al, 2002.

Após a interação com neurônios de projeção no corno dorsal, os axônios de neurônios de segunda ordem formam tratos aferentes que transmitem o impulso nociceptivo para estruturas do tronco cerebral e diencefalo, incluindo o tálamo, substância cinzenta, entre outros (Figura 4). Essas vias ascendentes podem ser divididas neuroanatomicamente entre: vias monossimpáticas e polissinápticas. As primeiras projetam diretamente para os centros cerebrais superiores, enquanto as

polissinápticas possuem uma estação de neurônios de segunda ordem antes de se estenderem para os centros cerebrais, como as vias pós-sinápticas da coluna dorsal e do trato espinocervical (MILLAN, 1999).

O tálamo possui um importante papel como a região responsável pela integração do impulso nocivo, a partir daí neurônios de terceira ordem transmitem os impulsos para o córtex cerebral resultando na consciência da dor. Esse circuito define todo o processo funcional da dor, sendo o núcleo ventropostolateral conhecido como o principal centro somatossensorial (WENG et al, 2000).

Figura 4: Via ascendente da nocicepção – segunda conexão.



Fonte: Pereira, 2006.

O controle da transmissão da dor também está sujeito a interferências pelas vias descendentes originadas no tronco cerebral, para inibição ou facilitação da nocicepção é necessária uma conexão entre um circuito modulador endógeno descendente e a substância cinzenta periaquedutal; porém esse sistema não é apenas inibitório ou facilitatório, cada forma de lesão induz um tipo diferente de resposta no circuito (RELLAND; GEHRED; MAITRE, 2018).

2.2 INFLAMAÇÃO

Todos os organismos vivos, desde os procariontes até o homem, possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos para manter o equilíbrio homeostático. Nos vertebrados a organização dessa resposta de combate constitui a reação inflamatória que incluem uma série de alterações bioquímicas, imunológicas e fisiológicas. Em outras circunstâncias, essa resposta inflamatória pode ser desencadeada inapropriadamente em resposta a outros tipos de lesões, quando isso ocorre a própria inflamação pode ser responsável pelos principais sintomas da doença, como por exemplo na artrite reumatoide (VOLTARELLI, 1994).

Essa reação de defesa é caracterizada pela reação dos vasos sanguíneos levando ao acúmulo de fluídos e células sanguíneas, o processo envolve como um todo o sistema neuro-endócrino que passa a exercer mecanismos modulatórios sobre o mesmo, inibindo ou facilitando o seu desenvolvimento. No primeiro século d. C. Celsius descreveu os cinco sinais cardinais que constituem a resposta inflamatória, sendo eles: rubor, calor, tumor e dor, posteriormente Galeno adicionou a estes um quinto elemento, a perda da função (FRANKLIN; ABOOTT; WESTBROOK, 1995).

Na maioria das vezes os mediadores inflamatórios agem localmente com a função de limitar as consequências e extensão da lesão tecidual. Nesses casos o processo inflamatório possui apenas repercussões locais, que podem até ser despercebidos, como por exemplo nos casos de tendinite ou foliculite, sendo uma resposta não específica direcionada a fase aguda. Nas condições em que essa capacidade homeostática é superada, ou pela gravidade do estímulo nocivo, ou insuficiência dos mecanismos reguladores, essa resposta passa a ser do tipo sistêmica (GRETEN, 2019).

2.2.1 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA E ADAPTATIVA

A reação inflamatória aguda apresenta dois componentes: a resposta imunológica inata, acredita-se que tenha se desenvolvido no início da evolução; e a resposta imunológica adaptativa (adquirida ou específica). A resposta inata é ativada imediatamente após uma infecção ou lesão, uma série de mecanismos são ativados automaticamente e a resposta imunológica adaptativa é colocada em alerta. Uma outra função importante da reação inata é a de impedir que a do tipo adaptativa danifique as próprias células do hospedeiro (RANG; DALE; RITTER, 2020).

A fase aguda da inflamação é caracterizada pelo recrutamento de polimorfonucleares e granulócitos, acompanhados por monócitos que irão se diferenciar em macrófagos. Os macrófagos teciduais, através de seus receptores Toll, reconhecem padrões moleculares associados à patógenos específicos nos microorganismos e liberam citocinas (VOLTARELLI, 1994). Essas citocinas pró-inflamatórias podem ser o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina (IL)-1, assim como outros mediadores (como prostaglandinas e histamina) que atuam sobre as células endoteliais vasculares das vênulas pós-capilares locais, resultando na expressão de moléculas de adesão da superfície celular e aumento da permeabilidade vascular (GRETEN, 2019).

O exsudato líquido contém os componentes de quatro cascatas enzimáticas proteolíticas, entre elas as que produzem Bradicinina (a partir do cininogênio), e o C5a e o C3a, ambos fazem parte do sistema complemento que é constituído por nove componentes principais. A ativação do complemento provoca a lise de bactérias, o C5a e o C3a estimulam os mastócitos a liberar histamina que faz vasodilatação nas arteríolas locais (RANG; DALE; RITTER, 2020).

O tecido lesado e as citocinas liberam prostaglandinas (PGI² e PGE²), que atuam como vasodilatador, e leucotrienos (LTB⁴). Essas citocinas estimulam a liberação de óxido nítrico (NO) que provoca um relaxamento do músculo liso, vasodilatação e aumento da liberação do plasma e de células sanguíneas para a área da inflamação (LEE, 2012). Os leucócitos aderem e migram através do endotélio vascular em direção ao patógeno (atraídos pelas quimiocinas, IL-8, C5a e LTB⁴), onde ocorre a fagocitose e morte dos microorganismos. Por último, as células *Natural killer* (NK), que são um tipo especializado de linfócitos ativados pela resposta imune que contém como alvos células que possuem o ligante do complexo principal de histocompatibilidade. Quando as células inflamatórias são estimuladas ou danificadas, entram em cena outros mediadores pró-inflamatórios, os eicosanóides (RANG; DALE; RITTER, 2020).

A resposta imunológica adaptativa é uma tática de defesa mais eficiente e altamente específica contra o patógeno invasor. As células principais desse processo são os linfócitos, que podem ser divididos em dois grupos principais: As células B, responsáveis pela produção de anticorpos e pela resposta imunológica humoral; e as células T, que fazem parte da fase de indução da resposta imunológica e nas reações reguladas por células (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Esse tipo de resposta acontece em duas fases: a fase de indução e fase efetora. Durante a fase de indução células T virgens portadoras dos co-receptores CD4 ou CD8 são apresentadas juntamente com o antígeno, essas células se transformam nas do tipo T citotóxicas e podem matar as que estão infectadas por vírus; os linfócitos T CD4 do tipo Th2 estimulam as células do tipo B a se proliferarem dando origem a plasmócitos secretores de anticorpos e células de memória; os linfócitos T CD4 do tipo Th1 se modificam e liberam citocinas que ativam macrófagos (RANG; DALE; RITTER, 2020).

A fase efetora depende das respostas mediadas por anticorpos e células. Os anticorpos auxiliam uma ativação mais seletiva do sistema complemento, uma fagocitose mais eficiente, a facilitação da destruição de parasitas pluricelulares e neutralização de alguns vírus e toxinas bacterianas. Por outro lado, as reações reguladas por células envolvem células T CD4⁺ que são liberadoras de citocinas, capacitando macrófagos a matarem patógenos intracelulares (VOLTARELLI, 1994).

2.2.2 REAÇÃO INFLAMATÓRIA SISTÊMICA

Ocorre quando a resposta inflamatória possui manifestações sistêmicas além das características locais, sendo inclusos no quadro febre, leucocitose e liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado com diferentes concentrações séricas e funções biológicas (Tabela 2). Essas proteínas podem ser fibrinogênio, componentes do sistema complemento, proteína C reativa, entre outros (PARK et al, 2017).

Tabela 2: Principais proteínas séricas e suas funções biológicas.

PROTEÍNA	FUNÇÃO BIOLÓGICA
Proteína C-reativa	Ativação do C, opsonização, fagocitose, citotoxicidade;
Amilóide sérico a (SAA)	Amiloidose, inibição de HDL e a da imunidade celular;
α 1-glicoproteína ácida	Transporte de proteínas;
C3 do complemento	Opsonização, anafilatoxina;
Ceruloplasmina	Inativação de radicais livres;
Fibrinogênio	Coagulação;
α 1-antiquimiotripsina	Antiprotease, inibição de IL-1;
Haptoglobina	Transporte de hemoglobina;
Amilóide sérico p (SAP)	Inibição da proteólise do amiloide;
Cininogênio plasmático	Precursor das cininas, pró-inflamatório;
Albumina	Transporte de proteínas;
Pré-albumina	Transporte de T3 E T4;
Transferrina	Transporte de ferro;

Fonte: Adaptado de Voltarelli, 1994.

A inflamação é constituída como um mecanismo de defesa, e não por si só, uma doença. O seu objetivo é restituir a estrutura e funções normais dos tecidos lesionados ou infectados e em grande parte dos casos é o que ocorre. Quando esse mecanismo não consegue eliminar o patógeno, essa resposta aguda pode ser modificada para uma reação inflamatória crônica, nessa situação o quadro pode persistir por semanas, meses ou anos, resultando em uma degeneração do tecido, promovendo proliferação local de células e de tecido conjuntivo, estando estreitamente relacionadas as causas de uma série de doenças crônicas (NASEF; MEHTA; FERGUSON, 2017).

2.2.3 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO

A resposta inflamatória é iniciada quando os receptores de reconhecimento identificam padrões moleculares expressos nas células por ativação através de vias inflamatórias de sinalização, incluindo Fator nuclear-Kappa B (NF- κ B), proteína-1 ativada (AP-1) e fatores reguladores de interferon. O que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e genes como, TNF- α , interleucinas do tipo 1 β ou IL-6, sintetase induzida de Óxido nítrico (iNOS), ciclo-oxigenase 2 (COX-2), juntamente com mediadores inflamatórios como PGE² e nitritos (PARK et al, 2017).

As prostaglandinas (PGs) desempenham um papel fundamental na inflamação, sua biossíntese tem um aumento significativo nos tecidos inflamados que contribuem para o desenvolvimento dos sinais cardinais da inflamação aguda. Diferentemente das histaminas, que é encontrada na maioria dos tecidos, as PGs são produzidas a partir de precursores fosfolipídicos quando há necessidade. O principal precursor é o Ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado de 20 carbonos contendo quatro duplas ligações (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A etapa inicial da síntese dos eicosanoides se dá a partir da liberação do Araquidonato, a partir dos fosfolipídeos por ação da enzima Fosfolipase A² (PLA²). A PLA² citosólica é ativada pela fosforilação e, portanto, o AA é liberado. O Ácido araquidônico livre é metabolizado por diversas vias, incluindo a da COXs e das Lipoxigenases. A via da COX possui duas principais isoformas: COX-1 e COX-2, convertendo AA em PGs e Tromboxanas; além disso a via da Lipoxigenase sintetiza Leucotrienos, Lipoxinas, entre outros (RANG; DALE; RITTER, 2020).

A COX-1 está presente na maioria das células como uma enzima constitutiva que atua como reguladora homeostática, enquanto a COX-2 não está normalmente presente, mas é bastante induzida nos processos inflamatórios e por isso acredita-se que possui uma maior importância para a terapia da inflamação. Os principais produtos da reação de catalisação são as PGs que podem ser do tipo: PGE², PGI², PGD², PGF² α e TXA². Nas plaquetas a TXA² é predominante, enquanto que no endotélio vascular a PGI² é mais presente (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Os prostanóides afetam a maioria dos tecidos e possuem uma variedade de funções, entre elas podemos citar as seguintes: A PGD² provoca vasodilatação, o relaxamento da musculatura gastrointestinal e uterina, inibe a agregação plaquetária, entre outros; PGF² α faz a contração do miométrio em humanos; PGI² promove

vasodilatação, inibe a agregação plaquetária e faz a liberação de renina; a TXA_2 proporciona vasoconstrição, agregação plaquetária e broncoconstrição (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

A PGE_2 apresenta diferentes funções a depender dos receptores estimulados, nos receptores EP1 provoca contração da musculatura lisa brônquica e gastrointestinal, nos receptores EP2 faz broncodilatação, vasodilatação, estimulação da secreção de líquido intestinal e relaxamento do músculo liso gastrointestinal; por último, nos receptores EP3 ela promove contração do músculo liso, inibição de ácido gástrico, aumenta a secreção gástrica de muco, inibe a lipólise, liberação de neurotransmissores autônomos e provoca a contração uterina (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Entre os mediadores químicos da inflamação destaca-se a Bradicinina, um nonapeptídeo formado a partir de uma α -globulina, através da via de cascata das proteases. As enzimas específicas que inativam a bradicinina são denominadas Cininases, entre elas destaca-se a Cininase II, que inativa as cininas através da remoção de dois aminoácidos C-terminais. A Bradicinina provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que resulta, em parte, da produção de PGI_2 e da liberação de NO (PARK, 2017).

A Bradicinina possui dois subtipos principais de receptores: B_2 , que está presente constitutivamente e o B_1 , induzido durante a inflamação. Quando ocorre a liberação de bradicinina pelos mastócitos, o receptor B_2 é sensibilizado e como resultado, tem-se uma diminuição do limiar de calor causando uma dor de longa duração acompanhada da resposta inflamatória (RANG; DALE; RITTER, 2020).

Em decorrência do processo inflamatório o NO desempenha um efeito global pró-inflamatório aumentando a permeabilidade vascular e a produção de PGs, além de ser um potente vasodilatador. Neste processo ainda são produzidos neuropeptídeos, entre os principais a Substância P e a Neurocinina A, que atuam nos mastócitos liberando Histamina e outros mediadores, produzindo contração do músculo liso e secreção de muco (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Com o recrutamento de leucócitos e macrófagos polimorfonucleares ocorre a liberação de fatores de regulação da fase aguda, denominadas citocinas que estão presentes no sítio da inflamação. As Citocinas são compostas de: Interleucinas (IL), quimiocinas, interferonas, fatores estimuladores de colônias, fatores de crescimento e TNFs (RANG; DALE; RITTER, 2020). Na célula-alvo elas se ligam e ativam receptores

específicos de alta afinidade que na maioria dos casos são regulados durante o processo inflamatório, diferente das quimiocinas que atuam nos receptores acoplados à proteína G. A deflagração da cascata de citocinas pró-inflamatórias faz com que ocorra a produção e secreção de citocinas, que resultam na sensibilização de nociceptores e interação com o SNC (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

Entre as citocinas pró-inflamatórias que atuam na resposta inflamatória aguda e crônica destacam-se primariamente o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1, IL-2, IL-6 e IL-7. A IL-1 compreende três citocinas, consistindo em dois agonistas, IL-1 α , IL-1 β , e um antagonista endógeno do receptor IL-1. Essas citocinas são liberadas por macrófagos e outras células durante a inflamação e iniciam a síntese e liberação de uma cascata de citocinas secundárias, denominadas de quimiocinas. Em contrapartida, tem-se as citocinas anti-inflamatórias, que inibem certos aspectos do processo inflamatório, nestas incluem o Fator transformador de crescimento do tipo β (TGF- β), IL-4, IL-10 e IL-13 (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

As interferonas fazem parte das citocinas pró-inflamatórias, liberadas pelas células T elas ativam macrófagos que aumentam a sinalização pró-inflamatória. Existem três classes de interferonas denominadas INF- α , INF- β e INF- γ . A INF- α e a INF- β possuem atividade antiviral, e a INF- α é usada como auxiliar no tratamento de infecções virais. A INF- γ desempenha função imunoreguladora sendo utilizada no tratamento de esclerose múltipla (SILVA et al, 2017).

2.2.4 TERAPIA FARMACOLÓGICA

As reações inflamatórias ou imunológicas inadequadas formam um componente significativo da maioria das doenças encontradas na clínica e consequentemente, os anti-inflamatórios são extensamente empregados em todos os ramos da medicina. As três principais classes medicamentosas são: Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou glicocorticoides (GCs), e os fármacos modificadores do curso da doença (FMCD) (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A utilização de substâncias químicas para melhorar a dor e a inflamação é uma das necessidades mais antigas da sociedade. Desde o isolamento da Salicilina por Leraux em 1829, várias descobertas foram realizadas nessa área da farmacologia. Uma das classes de fármacos mais utilizadas em todo o mundo são os AINEs, seu

mecanismo de ação primário é a inibição da enzima COX e posteriormente inibição da produção de PGs e Tromboxanos (MONTEIRO et al, 2008).

A COX-1 é uma enzima constitutiva presente na maioria dos tecidos, enquanto a COX-2 é induzida por células inflamatórias quando são ativadas. Há ainda a COX-3, descoberta por último ela foi demonstrada em estudos *in vitro* com linhagens de macrófagos; porém, estudos observaram que ela não originaria PGs, mas que na verdade distribuía as mesmas no córtex cerebral, medula espinhal e coração (CHANDRASEKHARAN et al, 2002).

A maioria dos AINEs são inibidores de ambas as enzimas (COX-1 e COX-2), porém variando no grau de inibição em cada uma das isoformas, esses são denominados de não seletivos. Os seletivos inibem apenas COX-2 e são conhecidos como COXIBs. Nos últimos anos a segurança desses medicamentos tem sido questionada pelo fato da inibição desta enzima aumentar o risco de incidentes cardiovasculares, e por esse motivo alguns fármacos foram retirados do mercado (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

Eventos gastrointestinais são os efeitos indesejados mais comuns no uso de AINEs por tempo prolongado, resultado da inibição de COX-1, responsável pela síntese de PGs que inibem a secreção ácida e protegem a mucosa gástrica. O mecanismo é dependente da inibição da COX na mucosa, por esse motivo mesmo que o fármaco seja administrado por via oral ou sistêmica, ocorrerá a lesão gástrica. Além disso pacientes que fazem uso de AINEs com histórico de doenças hepáticas podem apresentar efeito sobre o fluxo sanguíneo renal. Esses medicamentos também prolongam o sangramento por inibição de PGs que promovem agregação plaquetária, por esse motivo não é recomendado sua utilização em pacientes que irão se submeter a cirurgias. E por último, os fármacos que inibem COX-2 podem aumentar a probabilidade de eventos trombóticos, como infarto do miocárdio (JIN, 2015).

Outra classe de medicamentos utilizada no tratamento da inflamação são os glicocorticoides (GCs). Os GCs possuem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, e por este motivo sua utilização é recomendada nos quadros de artrite reumatoide, asma, gota, entre outras, dependendo da intensidade da dor e do grau da inflamação. Eles possuem o início de ação rápido e de longa duração, porém sua terapia por tempo prolongado pode provocar efeitos adversos (JIANG et al, 2020).

Os corticosteroides são hormônios secretados pela região cortical das glândulas supra-renais. Os GCs são produzidos pela zona fasciculada e estão

envolvidos em diversas funções fisiológicas e na adaptação em situações de estresse. O cortisol é o principal GC natural circulante no ser humano, sua síntese é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise anterior em resposta à liberação pelo hipotálamo, do neuropeptídeo denominado fator liberador de corticotrofina (CRH). O próprio cortisol atua sobre os receptores de glicorticóides presentes no hipotálamo e na hipófise, inibindo a liberação de CRH e ACTH (RANG; DALE; RITTER, 2020).

O mecanismo de ação desses medicamentos ocorre através de mecanismos genômicos e secundários, ou não genômicos provocados pela ativação dos receptores citosólicos de GCs. O cortisol, que é lipofílico, atravessa a membrana citoplasmática por difusão passiva; no citoplasma ele se liga a receptores proteicos específicos (RGC). O complexo glicocorticoide-receptor sofre uma modificação estrutural e assim é capaz de penetrar no núcleo celular, onde se liga a regiões promotoras de alguns genes, induzindo a síntese de algumas proteínas anti-inflamatórias como a Lipocortina-1, e de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico. Como a Lipocortina-1 suprime a produção de PLA² não ocorre a conversão dos fosfolipídios de membrana em AA e assim não ocorre a cascata da inflamação (BLARTLETT; LAPP; HUNTER, 2019).

Os efeitos adversos desta terapia a longo prazo ocorrem de maneira sistêmica, como alteração da distribuição de gordura, possibilidade de um quadro de osteoporose causada pela inibição de osteoblastos e produção de osteoclastos; além disso eles podem causar alterações endócrina-metabólicas, levando a casos de hipercalcemia ou alcalose metabólica; promovem a supressão do sistema imunológico, o que pode ser uma indicação clínica nos casos de doença autoimune ou de transplantes; além de alterações no sistema renal e cardiovascular (CARVALHO; CARDOSO; ERRANTE, 2016).

Os fármacos modificadores do curso da doença (FMDCs) surgiram por conta do interesse em diminuir os efeitos colaterais causados pela terapia com AINEs ou AIEs, e como uma tentativa de retardamento da progressão da doença, como por exemplo, nos casos de artrite reumatoide. Os efeitos desse tipo de terapia podem levar de seis semanas a seis meses para se tornarem clinicamente evidentes, embora alguns tenham um efeito mais rápido dentro de duas semanas ou menos (KASHMIRA et al, 2015).

Essa terapia altera o curso e a progressão da doença através da erosão provocada na cartilagem dos ossos, causado pelo bloqueio na produção ou na atividade dos mediadores inflamatórios. No caso do medicamento Abatacept, é realizada a inibição das células T através da ligação do CD80 ao CD86 impedindo a ligação ao CD28. A Ciclofosfamida faz parte dessa classe de medicamentos, onde o principal metabólito ativo é a fosforamida, que por ligações cruzadas no DNA inibe a replicação das células (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014). Atualmente seu uso individual ou combinado produz menos efeitos colaterais do que as terapias tradicionais com AINEs ou AIEs, aumentando a eficácia do tratamento e minimizando a dose efetiva dos fármacos utilizados (KASHMIRA et al, 2015).

2.3 GALECTINA-1

As lectinas são proteínas expressas tanto nos tecidos normais quanto nos patológicos, sendo capazes de reconhecer carboidratos de modo específico, associados (glicoconjugados), ou não a outras moléculas como proteínas e lipídeos. Elas foram identificadas em plantas como proteínas que apresentavam a habilidade de aglutinar diferentes tipos sanguíneos de modo seletivo (LI et al, 2019).

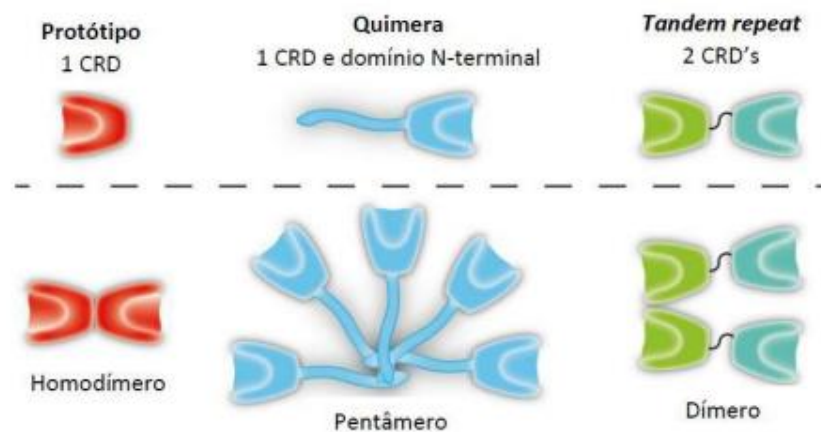
A primeira evidência direta da existência das lectinas em mamíferos ocorreu através de um estudo que demonstrava que o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de glicoproteínas séricas poderia ser regulado através da ação das lectinas que estavam presentes no fígado de coelhos (ASHWELL; MORELL, 1972). Na década de 70 as lectinas foram relacionadas aos β -galactosídios, e em 1994 Barondes et al, sugeriram agrupar essas proteínas com a formação da família das Galectinas (CALLEJON, 2008).

As galectinas são caracterizadas por possuírem uma afinidade aos ligantes β -galactosídios e por apresentarem uma sequência de 135 aminoácidos no domínio reconhecedor de carboidrato (CRD), e reconhecem parcialmente unidades repetidas de lactosaminas e polilactosaminas com resíduos de galactose acessíveis. O reconhecimento de carboidratos por esta molécula é um efeito reversível que ocorre por meio de equilíbrio químico regido pela lei de ação das massas (VARKI et al, 1999).

Atualmente, em mamíferos já foram descritos 15 galectinas sendo classificadas em três categorias: “proto-type”, quimera e “tandem repeat-type” (Figura 5). As “proto-

type” possuem apenas um tipo de CRD idênticos sendo apresentados como dímeros ou monômeros, desta classe fazem parte as galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15. A classe químera é representada pela galectina-3, ela possui um CRD e um domínio não-lectínio envolvido na oglomerização. Por último, as da classe “tandem repeat-hype” são compostas pelas galectinas 4, 6, 8, 9 e 12, e apresentam dois CRDs diferentes unidos por um peptídio ligador (CALLEJON, 2008; RABINOVICH; CROCI, 2012).

Figura 5: Representação da estrutura das lectinas quanto sua classificação.



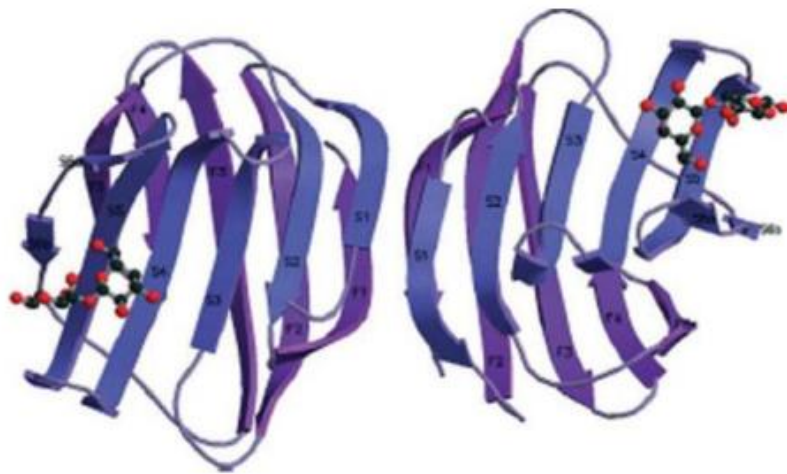
Fonte: Gomes, 2018.

As galectinas apresentam várias funções, entre elas: adesão celular, regulação do crescimento celular, embriogênese, metástase, *splicing* do pré RNAm, imunomodulação, inflamação e apoptose (RABINOVICH; RUBINSTEIN; FAINBOIN, 2002).

A galectina-1 (Gal-1) foi observada em diversas células relacionadas a resposta inflamatória como neutrófilos, mastócitos, macrófagos, linfócitos T e B e células endoteliais. Seu gene localiza-se no cromossomo 22 entre as áreas q12-q13, e em camundongos na região E do cromossomo 15. A atividade desta lectina é observada na maioria das vezes no meio extracelular, porém ela também é capaz de fazer interações através do complexo proteína-proteína afetando também suas funções intracelulares. A porção da molécula envolvida nessas interações ainda permanece desconhecida (MACHADO, 2014).

O dobramento completo da Gal-1 consiste em duas folhas β antiparalelas (Figura 6) se apresentando na forma de dímero. A integridade do dímero é mantida por interações entre os monômeros na interface e através do núcleo hidrofóbico, sendo este um dos fatores que justifica a estabilidade do dímero em termos moleculares (GOMES, 2018).

Figura 6: Estrutura da galectina-1.



Fonte: Gomes, 2018.

A Gal-1 participa da resposta imune inata e adaptativa promovendo o efeito anti-inflamatório, os mecanismos envolvidos estão relacionados com o fato da Gal-1 modular a secreção de citocinas pró-inflamatórias e participar da homeostasia de leucócitos, inibindo a secreção de IL-2, INF γ , TNF- α e aumentando os níveis de secreção de IL-5 ou IL-10 nas células T. Além disso também inibe a liberação de AA, produção de NO e a expressão de iNOS em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) (RABINOVICH et al, 2000; CORREA et al, 2003).

A expressão de Gal-1 foi identificada em órgão linfoides em locais imunes privilegiados, como placenta e córnea, o que sugere que a Gal-1 poderia desempenhar um importante papel na geração e manutenção da tolerância imunológica central e periférica (RABINOVICH, 1999). Dados sugerem que ela pode ser secretada pela translocação direta do citosol pela membrana plasmática através de fatores no citosol e na membrana (NICKEL, 2005).

Em condições normais ela é expressa em vários tecidos como músculo, timo, próstata, fígado, baço, células endoteliais, pele e cérebro. Em condições patológicas pode ser expressa em carcinomas de tireoide, cólon, ovário, melanoma e linfoma (CALLEJON, 2008). A expressão, secreção e distribuição celular são altamente susceptíveis à modulação por diferentes estímulos inflamatórios, como por exemplo, peptídeos quimiotáticos, LPS, TNF- α e carragenina. A ação inibitória de Gal-1 exógena em condições *in vitro* e *in vivo* no recrutamento leucocitário foram avaliadas, sugerindo que pequenas quantidades de Gal-1 encontradas nos neutrófilos transmigraados induzidos por IL-8, indicariam processo de secreção (GIL et al, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Realizar pesquisa bibliográfica em artigos publicados que demonstrem o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da Galectina-1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar os problemas do tratamento atual para a dor e inflamação.
- Investigar as vias metabólicas em que a Galectina-1 realiza seu efeito terapêutico.
- Identificar os mecanismos de ação da Galectina-1 de acordo com os artigos selecionados.
- Avaliar se a Galectina-1 possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

4. METODOLOGIA

A revisão de literatura é o processo de busca, que envolve localizar, analisar, sintetizar e interpretar a investigação prévia da área de estudo. A pesquisa em questão é enquadrada no tipo de revisão narrativa da literatura, não utilizando critérios integrativos ou sistemáticos para busca e análise crítica (CORDEIRO et al, 2007).

O presente trabalho foi elaborado a partir de busca bibliográfica feita nos seguintes bancos de dados: *ScienceDirect*, *PubMed*, Google acadêmico, periódicos CAPES e *Scientific eletronic library online* (SCIELO). As buscas foram realizadas a partir dos seguintes termos: “nociception”, “antinociceptive”, “inflamação”, “inflammation”, “galectina-1”, “galectin” e “galectin-1”. Também foram utilizados livros de farmacologia e bioquímica como fonte de pesquisa. Os dados foram coletados do mês de junho de 2020 a dezembro de 2020.

Os critérios inclusos nesse estudo foram artigos de pesquisa disponíveis em inglês nas bases descritas no período de 2012 a 2019. Os critérios de exclusão utilizados foram artigos parcialmente disponíveis e estudos que não abordassem a temática do assunto.

Com base no objetivo este trabalho pode ser classificado como uma pesquisa exploratória, que visa proporcionar maior familiaridade com o problema, e como resultado torna-lo mais explícito a construir hipóteses. Sendo assim, a pesquisa exploratória tem por finalidade refinar os dados da pesquisa e o desenvolvimento seguro das hipóteses, aumentando o grau de objetividade da pesquisa (GERHARDT; SILVEIRA, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente o presente estudo foi elaborado com artigos publicados de 2012 a 2019, dentre os artigos selecionados, todos foram selecionados de revistas do meio científico: *The American Journal of Pathology*, *International Immunopharmacology*, *European Journal of Pharmacology*, *The Faseb Journal* e *Brain, Behavior and Immunity*. Em todos os estudos foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, para analisar a eficácia de Galectina-1 no meio celular e em ratos ou camundongos.

Os resultados obtidos indicam o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da proteína Gal-1, por ser expressa em vários tecidos essa molécula pode ser utilizada como estudo na terapia de várias patologias, sendo considerada uma molécula multifuncional, participando de uma série de processos biológicos. Dentre esses processos podemos citar controle de sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, apoptose, gênese de tumores, interação patógeno-hospedeiro e homeostase de células T (LEFFER et al, 2004).

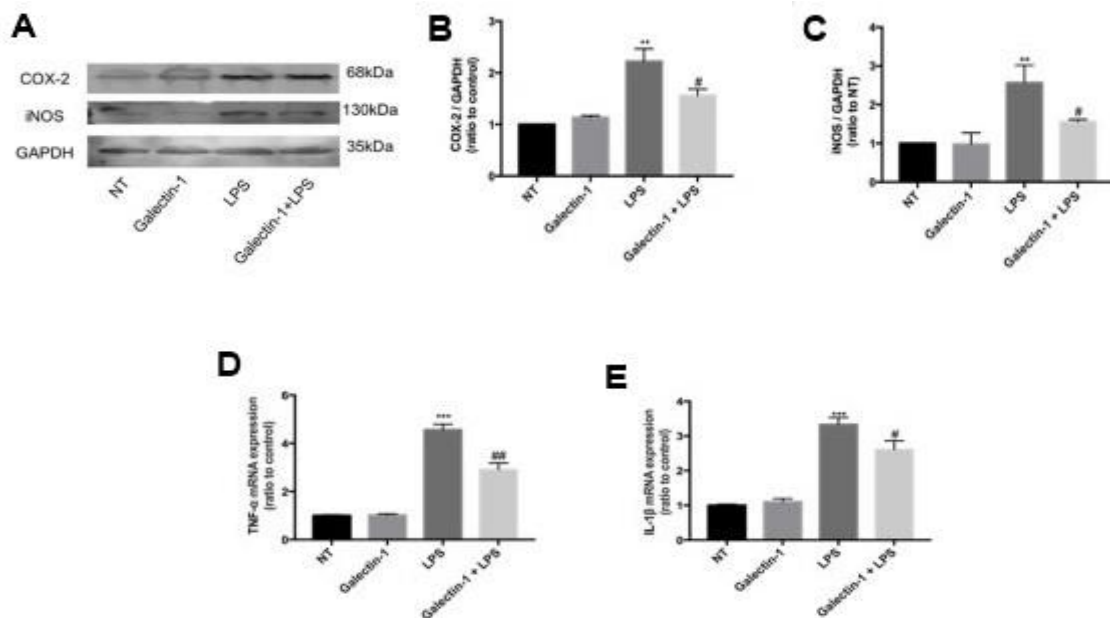
5.1 GALECTINA-1 ATENUA A NEURODEGENERAÇÃO NO MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON AO MODULAR O EIXO MICROGLIAL MAPK/ I κ B/ NF κ B ATRAVÉS DE SEU RECONHECIMENTO DO DOMÍNIO DE CARBOIDRATOS

Essa pesquisa foi realizada com o objetivo de elucidar a função exógena da Gal-1 no tratamento da doença de Parkinson (DP), visando o desenvolvimento de uma terapia inovadora avaliando seus efeitos terapêuticos na ativação da micróglia e degeneração neuronal no modelo de DP em camundongos induzida por um precursor da neurotoxina MPP⁺ (MPTP) e no modelo *in vitro* através de células de neuroblastoma humano, SK-N-SH.

Para induzir a ativação microglial foi administrado 1 μ g/mL de Lipopolissacarídeos (LPS) no meio de cultura de células microgliais BV-2, sendo cultivadas com RPMI 1640 suplementado por FBS a 10% e 2 nM de L-Glutamina. Através da ativação e liberação de citocinas pró-inflamatórias a partir de BV-2, esse meio celular foi usado para indução inflamatória em células SK-N-SH, que foram cultivadas DMEM suplementado com 10% de FBS. Para tratamento da inflamação induzida foi administrado 0,1, 1 ou 10 μ g/mL de Gal-1 para avaliação no ensaio de MTT, apoptose celular e análise de liberação de proteínas.

No estudo de Li et al (2019) a Gal-1 recombinante (rhGal-1) inibiu a ativação de células microgliais BV-2 no modelo de inflamação induzida por LPS, através do teste de Western blot (Gráfico 1 A) foi observado como a rhGal-1 desempenhava seu papel na secreção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de iNOS e COX-2. LPS induz a inflamação em células BV-2 e produz altos níveis de citonas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β e TNF- α . No entanto, a pré-incubação de rhGal-1 (1,0 μ g/mL) reduziu drasticamente os níveis de COX-2 (29,58%), iNOS (39,23%), TNF- α (39,15%), IL-1 β (13,33%) (Gráfico 1 B; C; D; e, respectivamente).

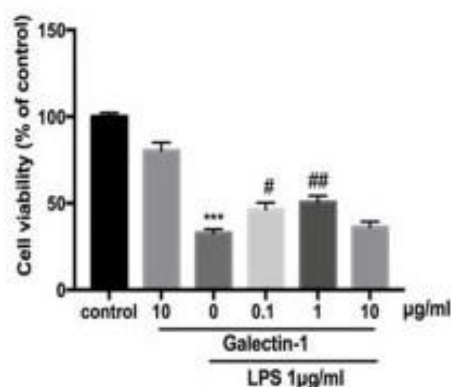
Gráfico 1: A regulação positiva do nível de proteína COX2 e iNOS induzido por LPS. (a): análise de western blot para Cox2 e iNOS; (b-c): análise estatística; (d-e): A regulação positiva do nível de mRNA de TNF- α e IL-1 β induzido por LPS foi revertida por rhGal-1



Fonte: Li et al, 2019.

No ensaio sobre viabilidade celular usando um modelo *in vitro* de neurotoxicidade mediado por inflamação, a viabilidade celular de SK-N-SH foi aumentada em 42,1% e 54,7%, respectivamente, quando tratado com rhGal-1, indicando que essa proteína atenuou a neurotoxicidade induzida na micróglia (Gráfico 2) (LI et al, 2019).

Gráfico 2: Ensaio de viabilidade celular com MTT. Os resultados mostram que rhGal-1 protegeu as células do processo inflamatório induzido por LPS.



Fonte: Li et al, 2019.

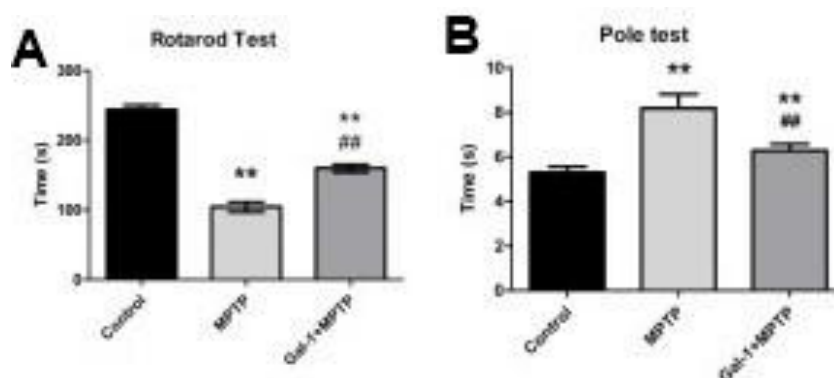
Para os ensaios *in vivo* em camundongos machos C57BL/ 6J, foi realizado um modelo de indução de DP através de MPTP, os animais receberam cinco injeções intraperitoneais (ip) de 25 mg/Kg de MPTP (base livre) dissolvido em 0,9% de solução salina por 5 dias; no grupo controle foi usado apenas solução salina durante 5 dias. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: I) Grupo controle: solução salina (25 mg/Kg de peso corporal, ip); II) Grupo controle de MPTP: MPTP (25 mg/Kg de peso corporal, ip) para criar o modelo parkinsoniano e tratado injeção de PBS no corpo estriado; III) Grupo MTPP + Galectina -1: MPTP (25 mg/Kg de peso corporal, ip), para indução de DP e tratado com Galectina-1 (0,5 mg/Kg) em *striatum*.

Todos os animais foram sacrificados sete dias após a injeção de MPTP e seus cérebros foram colhidos, seccionados e processados para fazer ELISA, Western blot e Imuno-histoquímica. Além desses, os animais fizeram teste para avaliar a coordenação motora e equilíbrio, como teste de pólo e placa rotatória.

Os efeitos protetores da rhGal-1 no modelo de DP induzido por MPTP foram examinados em camundongos C57BL tratados com MPTP (25 mg / kg de peso corporal, ip) durante 5 dias. O comportamento motor e o equilíbrio foram avaliados pelo teste de placa rotatória e de polo, no primeiro os animais foram colocados em placas rotativas para analisar o período de permanência na barra, sendo treinados uma vez por dia, durante 3 dias antes do experimento, o teste foi realizado durante 2 dias consecutivos; no teste de polo os camundongos foram colocados no topo do tubo e o tempo total para chegar ao outro extremo foi registrado, cada animal foi testado três vezes com intervalo de 2 minutos entre cada um (LI et al, 2019).

No teste com placa rotatória os camundongos do grupo parkinsoniano permaneceram menos tempo na haste em comparação com os grupos controle, por outro lado, o grupo que recebeu pré-tratamento com rhGal-1 teve seu período de latência prolongado em 53,2% (Gráfico 3 A). Da mesma maneira ocorreu no teste de polo, os animais tratados com rhGal-1 permaneceram por mais tempo na haste (Gráfico 3 B). Com esses resultados podemos concluir que o tratamento com rhGal-1 anulou os déficits motores induzidos pelo MPTP em camundongos parkinsonianos (LI et al, 2019).

Gráfico 3: Teste rotatório e de polo para avaliar a função motora de camundongos com DP.



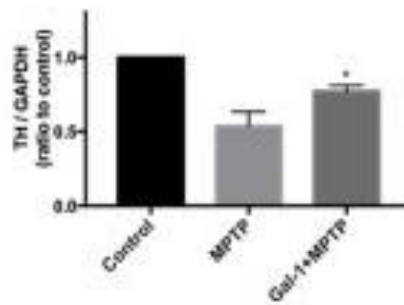
Fonte: Li et al, 2019.

A Tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima de extrema importância na síntese de Dopamina (DA), sabe-se que DA faz parte da família das Catecolaminas que são compostos derivados do aminoácido Tirosina. A DA é produzida no cérebro pela conversão da Tirosina em Levodopa (L-DOPA), por ação da enzima TH. A DP é causada por uma rarefação das células da substância negra que ocasiona intensa diminuição dos níveis desse neurotransmissor nas áreas estriatais, onde os neurônios se projetam, condicionando o aparecimento da maior parte dos sintomas da doença, como tônus aumentado, dificuldade de iniciar movimentos, tremor rítmico nas extremidades, entre outros. (GOULART et al, 2004).

Dessa maneira, avaliou-se os efeitos de rhGal-1 nos neurônios dopaminérgicos, para isso sessões do mesencéfalo foram analisadas para observar a expressão de TH. O número dessa enzima diminuiu no modelo de DP induzido por MPTP, como resultado houve uma diminuição nos níveis de DA. No entanto, esse efeito foi revertido nos animais pré-tratados com rhGal-1 (0,5 mg/Kg) 1 dia antes da

indução por MPTP (Gráfico 4), rhGal-1 também bloqueou a diminuição de TH na substância negra dos animais com indução de DP (LI et al, 2019).

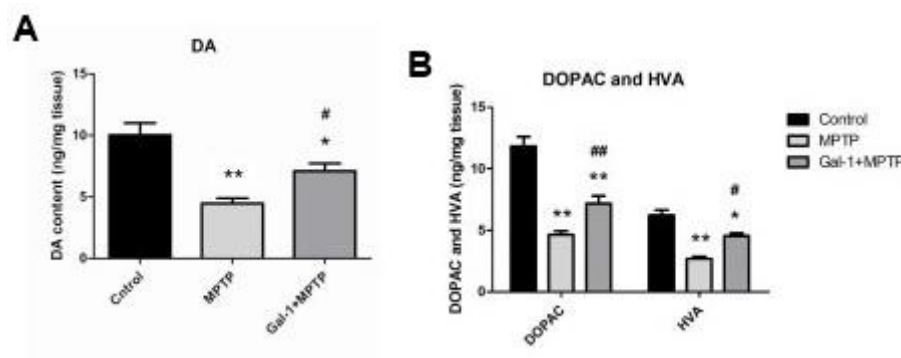
Gráfico 4: Análise quantitativa dos neurônios TH-positivos no mesencéfalo.



Fonte: Li et al, 2019.

Na avaliação de DA estriatal, ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e de ácido homovanílico (HVA) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Gráfico 5 A e B), ficou evidente que o tratamento com Gal-1 atenuou significativamente os níveis de redução de DA e seus metabólitos, indicando que o tratamento com rhGal-1 previne a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (LI et al, 2019).

Gráfico 5: DA e seus metabólitos DOPAC e HVA no corpo estriado avaliados por HPLC.



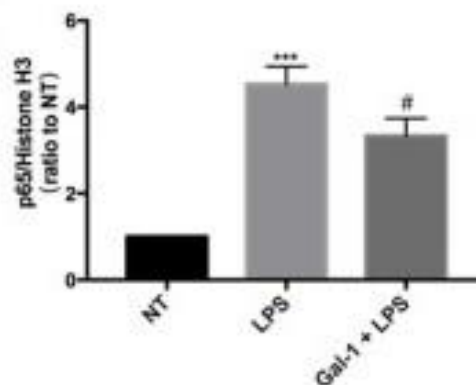
Fonte: Li et al, 2019.

A via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) é altamente conservada por quinases do tipo serina/treonina, que consiste de pelo menos três grandes famílias. Por transdução de sinal da superfície da célula para o núcleo a família MAPK regula diversas funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (SILVA et al, 2009). A micróglia são macrófagos

residentes do SNC e exerce algumas funções benéficas, como alimentação de patógenos e detritos celulares frente um processo inflamatório. No entanto, quando a ativação dessas células ocorre de maneira crônica se torna prejudicial para a sobrevivências dos neurônios, sendo este o efeito duplo da ativação microglial (KAUR; SHARMA; DESHMUKH, 2019). A reatividade microglial de maneira crônica foi confirmada no quadro de DP, gerando um processo de *up-regulation* de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no parênquima cerebral, resultando em danos inflamatórios nos neurônios dopaminérgicos causando morte neuronal. Estes neurônios mortos exacerbam cada vez mais a ativação da micróglia, formando um ciclo vicioso que alguns pesquisadores justificam o avanço da doença (JOE et al, 2018).

O fator nuclear kappa B (NFkB) é uma proteína que está presente na forma de complexo latente e inativo no citoplasma. Quando a célula microglial recebe qualquer um dos sinais inflamatórios extracelulares, o NFkB entra no núcleo e ativa a expressão gênica de algumas citocinas pró-inflamatórias, como COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, entre outros. Como rhGal-1 diminui o processo inflamatório induzido por LPS, foi avaliado a translocação de NFkB/p65 para investigar o mecanismo molecular de rhGal-1 contra a ativação microglial. Como observado a translocação do citoplasma para o núcleo de NFkB/p65 foi parcialmente revertido pela administração de rhGal-1, reduzido em 28,9%, indicando que rhGal-1 diminuiu a ativação de NFkB por LPS (Gráfico 6) (LI et al, 2019).

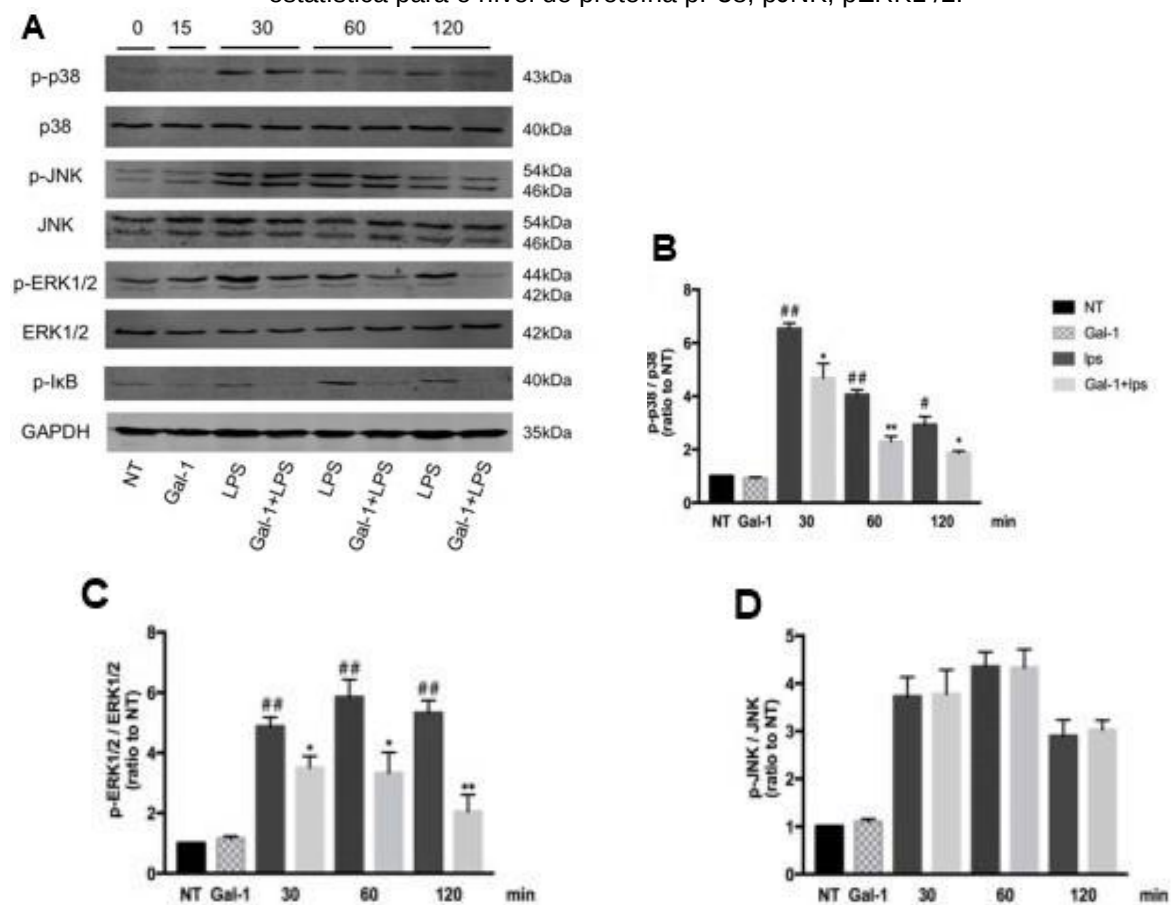
Gráfico 6: Análise estatística de Western blot para detectar translocação nuclear de p65.



Fonte: Li et al, 2019.

Através dos testes de Western blot foi possível observar que a atividade de NFkB é principalmente regulada pela interação com proteínas IKB inibitórias, na maioria das vezes NFkB é um complexo ligado a IKB no citoplasma. A ativação do NFkB é iniciada pela degradação induzida por sinal de proteínas Ikb, quando ativado por sinais, geralmente vindo de fora da célula, Ikb é fosforilado e degradado. Dessa maneira, os resultados mostraram que o nível de pIKB foi revertido por rhGal-1 (Gráfico 7 A). A ativação da micróglia por LPS na presença de rhGAL-1 resultou na diminuição da fosforilação de p38 (Gráfico 7 B) e da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Gráfico 7 C), mas nenhuma inibição na fosforilação de c-Jun N-quinase terminal (JNK) (Gráfico 7 D). Assim, a rhGal-1 atua inibindo a ativação da micróglia principalmente por modulação das vias p38 e ERK (Li et al, 2019).

Gráfico 7: Análise estatística de Western blot para detectar a translocação nuclear de p65. (a): Western blot representativo de p65 para proteínas extraídas do núcleo ou citoplasma; (b-c-d): Análise estatística para o nível de proteína pP38, pJNK, pERK1 /2.



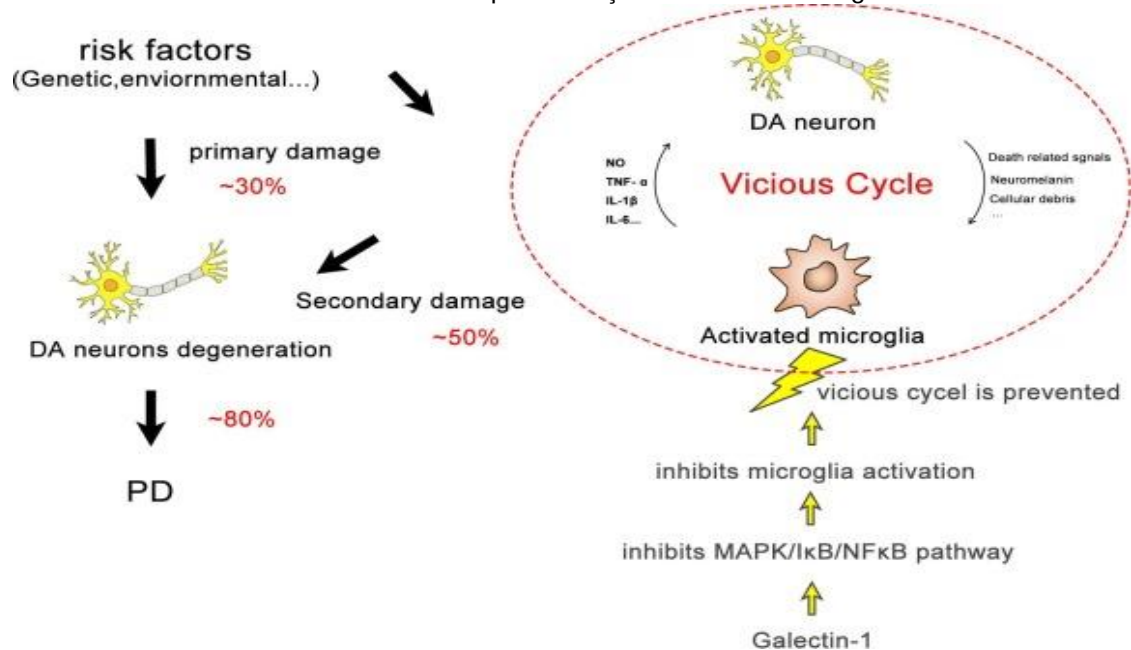
Fonte: Li et al, 2019.

Até o momento quatro vias de transdução de sinal foram identificadas, sendo elas, p38, ERK, JNK e ERK5, envolvidas no processo inflamatório estas vias são ativadas principalmente por fatores de crescimento que se ligam às tirosinas quinases receptoras de membrana (RTKs) e de citocinas que se ligam a receptores ligados a tirosinas quinases da família “*Janus quinases*” (JAK) (DONG et al, 2014). p38 está envolvido na regulação de NFkB, enquanto JNK é responsável pela fosforilação de c-Jun, um componente da proteína-1 ativadora (AP-1), estas medeiam as respostas transcricionais e pós-transcricionais a estímulos pró-inflamatórios. As vias ERK e p38 ainda estão envolvidas na secreção de TNF- α na micróglia (HOLTMAN; SKOOLA; GLASS, 2017). Como ERK1 / 2 e p38 foram desativados, I κ B não pode ser fosforilado e ligado a NFkB. Assim, NFkB não poderia se translocar para o núcleo e iniciar a transcrição de IL-1 β e TNF- α , causando inibição da ativação microglial (LI et al, 2019).

As galectinas são conhecidas por seu papel intra e extra celular através do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), para determinar se a modulação de rhGal-1 na ativação microglial está relacionado com seu CRD foi adicionado β -galactose juntamente com rhGal-1 ao meio de cultura da micróglia. Os resultados mostraram efeitos protetores contra LPS, e a inativação da via p38 e ERK1/2 foi anulada pela administração de β -galactose, ou seja, a modulação de rhGal-1 no eixo MAPK possivelmente está relacionada com seu CRD, pois a β -galactose ocupa competitivamente os locais de ligação do receptor (LI et al, 2019).

O ciclo vicioso é uma das teorias responsáveis pela progressão da DP, de acordo com essa teoria, os fatores de risco induzem a morte de neurônios DA. Isso contribui com cerca de 30% da morte neuronal na DP, chamada de dano primário. A micróglia ativada secreta citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no parênquima cerebral, induzindo dano inflamatório aos neurônios DA e causando morte neuronal. Dessa maneira, os resultados mostraram que Gal-1 inibiu a ativação da micróglia induzida por LPS *in vitro* e MPTP *in vivo*, indicando que tem potencial para prevenir a formação de um ciclo vicioso e, conseqüentemente, proteger os neurônios da degeneração (Figura 7). Assim, Gal-1 pode ser uma droga potencial para desenvolver uma terapia de doença modificada para DP. Também é necessário avaliar sistematicamente a segurança da galectina-1 antes de chegar à clínica (LI et al, 2019).

Figura7: Galectina-1 quebra o ciclo vicioso e protege os neurônios dopaminérgicos do dano secundário causado pela ativação crônica da micróglia.



Fonte: Li et al, 2019.

5.2 FALTA DE GALECTINA-1 EXARCEBA HEPATITE CRÔNICA NO FÍGADO, FIBROSE E CANCINOGÊNESE EM HEPATÓCITOS MURINOS NO MODELO DE CARCINOMA

Nessa pesquisa Potikha et al (2019) propôs explorar o papel regulatório de Gal-1 na inflamação crônica do fígado (CLI) e no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC) em camundongos *Abcb4* (*Mdr2*-KO), que não possuem a glicoproteína P *Mdr2*, responsável pelo transporte de fosfatidilcolina, estando relacionada com tratamento de alguns tipos de tumores, logo a ausência desta proteína resulta em desenvolvimento acelerado de CHC. Sabe-se também que essa linhagem possui uma maior expressão de Gal-1, principalmente no fígado, a partir daí foram criados mutantes duplos *Mdr2*-KO/*Lgals1*-KO e camundongos double-KO (dKO) em cepas FVB e B6.

Nesse estudo os camundongos foram originados de duas cepas, FVB e B6, ambos com características fenotípicas diferentes e consequentemente respostas inflamatórias distintas. Através de estudos anteriores (POTIKHA et al, 2013) foram evidenciadas algumas diferenças entre essas cepas que poderiam ser responsáveis pelos diferentes cursos de Hepatite crônica e no desenvolvimento de CHC nos camundongos *Mdr2*-KO (Tabela 4). Entre elas estão: Deficiência da proteína C5 do

complemento em FVB; mutação no DNA mitocondrial em FVB; e polimorfismo Tnfaip3 (A20), responsável pela supressão de feedback na ativação de NFkB induzido por TNF- α na cepa B6. Logo, através dos resultados desse estudo foi concluído que B6 possui uma resistência maior a hepatite crônica e desenvolvimento de CHC causados pela mutação Mdr2-KO, levantando a hipótese de que a cepa FVB tem a atividade anti-inflamatória de Gal-1 prejudicada (POTIKHA et al, 2013).

Tabela 3: Tabela descrevendo as diferenças genéticas encontradas em Mdr2-KO da cepa FVB e Mdr2-KO da cepa B6.

Distribuição dos genes expressos diferencialmente no fígado de Mdr2-KO/FVB e Mdr2-KO/B6 em comparação com seus grupos controle correspondentes em diferentes categorias, de acordo com funções biológicas.		
Termo para FVB total	Contagem	Valor P
GO:0048518: Regulação positiva de processos biológicos* $\uparrow\downarrow$	97	5.74E-05
GO:0006952: Resposta de defesa* $\uparrow$	39	7.10E-05
GO:0045595: Regulação da diferenciação celular* $\uparrow$	36	3.55E-05
GO:0006629: Processo Metabólico de Lipídio* $\uparrow\downarrow$	50	6.45E-04
GO:0042127: Regulação da proliferação celular $\uparrow$	41	7.16E-04
GO:0050776: Regulação de resposta imune* $\uparrow$	19	0.0018
GO:0045619: Regulação da diferenciação de linfócitos $\uparrow$	8	0.0128
GO:0051726: Regulação do ciclo celular $\uparrow$	18	0.0128
GO:0008610: Processo biosintético de lipídios $\uparrow$	21	0.0007
GO:0006979: Resposta ao estresse oxidativo $\uparrow$	9	0.0362
Termo para B6 total	Contagem	Valor P
GO:0048518: Regulação positiva de processos biológicos* $\uparrow$	31	0.002
GO:0006952: Resposta de defesa* $\uparrow$	17	5.97E-05
GO:0045595: Regulação da diferenciação celular* $\uparrow$	12	0.005
GO:0006629: Processo Metabólico de Lipídio* $\downarrow$	17	0.007
GO:0050778: Regulação do processo de resposta imune* $\uparrow$	6	0.021

David software (nível 3) foi usado. 905 genes para o Mdr2-KO/FVB e 323 genes para a cepa Mdr2-KO/B6, com um limiar para expressão diferencial de pelo menos 1,8 vezes (a média de camundongos Mdr2-KO em relação à média de controle de camundongos Mdr2+/-) foram submetidos a GO análises. As setas direcionadas para cima e para baixo designam os genes regulados para cima e para baixo, respectivamente, que compunham os termos. *O termo "GO" é comum para os genes Mdr2-KO/FVB e Mdr2-KO/B6 expressos diferencialmente.

Fonte: Adaptado de Potikha et al, 2013.

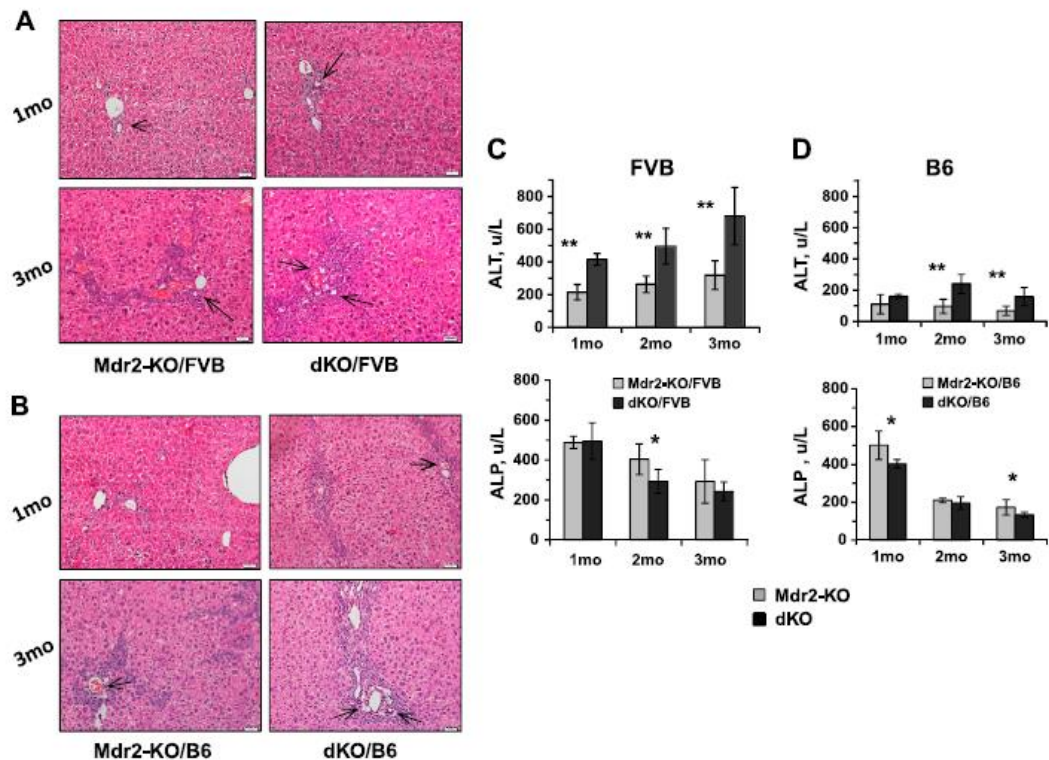
A acentuada regulação positiva de Gal-1 no fígado e sua ampla atividade anti-inflamatória em diversas patologias levou Potikha e outros pesquisadores a investigar o papel dessa proteína no desenvolvimento de CHC mediado por CLI, através de uma inibição da lectina que codifica Gal-1 (Lgals-1) e mutação de Mdr2 na expressão de uma variedade de tumores. Em ambas as cepas B6 e FVB os animais do sexo

feminino desenvolveram tumores mais cedo do que os do sexo masculino. Na base genética FVB os tumores apareceram mais cedo do que na cepa B6, portanto os animais de FVB foram sacrificados antes de B6 (POTIKHA et al, 2019).

Usando um modelo estabelecido de CHC mediado por CLI, nas idades indicadas os animais foram anestesiados com Isoflurano e sacrificados por deslocamento cervical. Os fígados intactos foram levados para processamento e pesados, onde uma parte foi fixada em Formaldeído tamponado neutro a 4% para imuno-histoquímica. Cortes corados com Hematoxilina e Eosina foram usados para a morfologia do fígado, e a coloração tricotômica de Masson foi usada para avaliar a fibrose hepática. Enquanto o tecido restante foi congelado para análise de expressão gênica pelo RNA e de proteínas. Para a análise de sangue a lesão hepática foi avaliada através da atividade de Alanina aminotransferase (ALT) e Fosfatase alcalina (ALP) no soro.

Através da análise de sangue foi possível observar que camundongos Mdr2-KO em idade precoce, de ambas as cepas, apresentaram proliferação no ducto biliar aumentadas com lesão de hepatócitos (Figura 8 A-B), que ficaram evidentes pela análise estatística, apresentando níveis elevados de ALT no soro (Figura 8 C-D). A enzima ALT é presente em vários tecidos, mas apresenta sua maior expressão no fígado, responsável pela catalisação do aminoácido Alanina em Piruvato, ela é considerada um marcador específico de dano hepático (FILIPPIN et al, 2004).

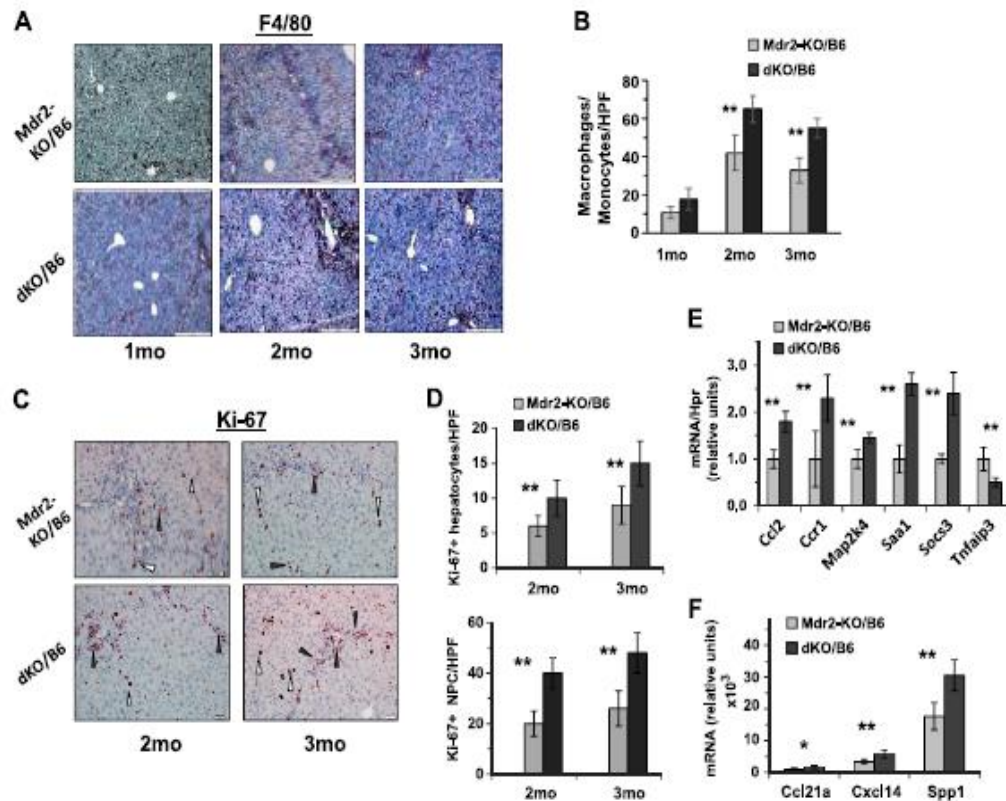
Figura 8: Análise de sangue caracterizando aumento de reações ductobiliares e lesão de hepatócitos no fígado de dKO de acordo com a idade. (a-b): Coloração com hematoxilina e eosina de seções representativas do fígado de camundongos Mdr2-KO e dKO de cepas FVB e B6, as reações ductais são mostradas por setas. (c-d): Atividade das enzimas hepáticas (unidades por litro) no soro de jovens FVB e B6 do sexo masculino. Para cada ponto de tempo, 6-9 ratos foram usados.



Fonte: Potikha et al, 2019.

Na imuno-histoquímica ficou evidente um maior recrutamento de monócitos e macrófagos na cepa dKO/B6, em comparação com camundongos Mdr2-KO em 2 e 3 meses de idade (Figura 9 A-B). O aumento da CLI também foi refletido pelo aumento da proliferação de hepatócitos e células não parênquimais (NPC) em fígados de dKO/B6 em comparação com Mdr2/B6 (Figura 9 C-D). Para entender o mecanismo molecular subjacente ao aumento da lesão hepática e da proliferação celular de camundongos Mdr2-KO e dKO das cepas B6, foi realizada análise estatística dos níveis de transcrição de vários genes reguladores que participam da resposta imune e do processo inflamatório através de RT-qPCR e tecnologia Nanostring, apenas o gene *Tnfrsf10b* apresentou níveis mais altos em dKO em comparação com Mdr2-KO (Figura 9 E-F) (POTIKHA et al, 2019).

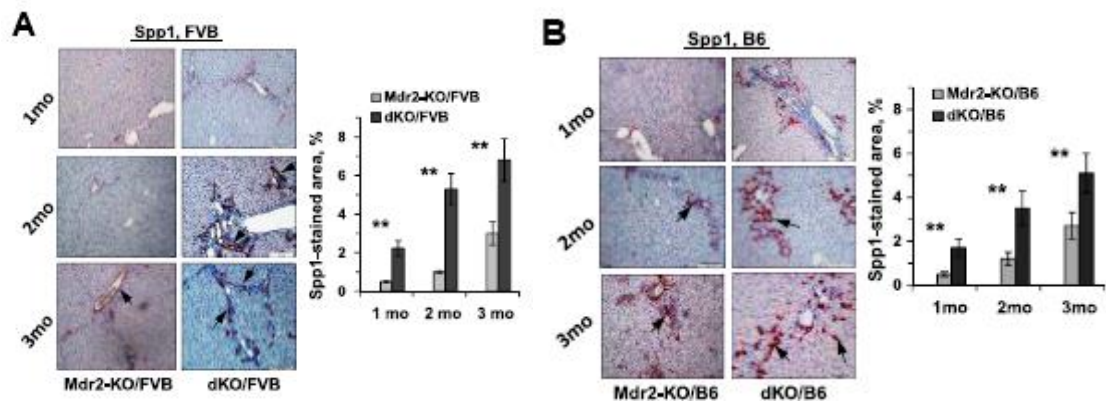
Figura 9: Aumento da inflamação e proliferação de células hepáticas em fígados dKO / B6 vs. Mdr2-KO / B6. (A): Imunocoloração F4/80 nos fígados Mdr2-KO / B6 e dKO. sinais marrom-avermelhados distribuídos no tecido representam F4/80+ monócitos e macrófagos. (B): Quantificação de células F4/80+ conforme apresentado em A em fígados Mdr2-KO e dKO. (C): Imunocoloração de Ki67 nos fígados de camundongos Mdr2-KO/B6 e dKO/B6 de 2 e 3 meses de idade. Triângulos brancos apontam para hepatócitos e triângulos pretos para NPC. (D): Quantificação de hepatócitos Ki67-positivos e NPC positivos para Ki67 como apresentado em “C”. (E-F): Expressão de genes associados à inflamação no fígado de camundongos Mdr2-KO e dKO de 2 meses de idade atribuído por RT-qPCR em “E” ou por ensaio Nanostring em “F”.



Fonte: Potikha et al, 2019.

O aumento da expressão de *Spp1* em dKO vs. Fígados Mdr2-KO de ambas as cepas de camundongos foi confirmado pela imunocoloração, o gene foi expresso principalmente das células epiteliais biliares (setas com cabeça fechada) (Fig. 10 A-B). A osteopontina (*Opn*) no fígado de todos os camundongos Mdr2-KO testados foi expressada principalmente em colangiócitos (POTIKHA et al, 2019).

Figura 10: Aumento da gravidade da colangiopatia em fígados dKO/B6 vs. Mdr2-KO/B6 em idade jovem.



Fonte: Potikha et al, 2019.

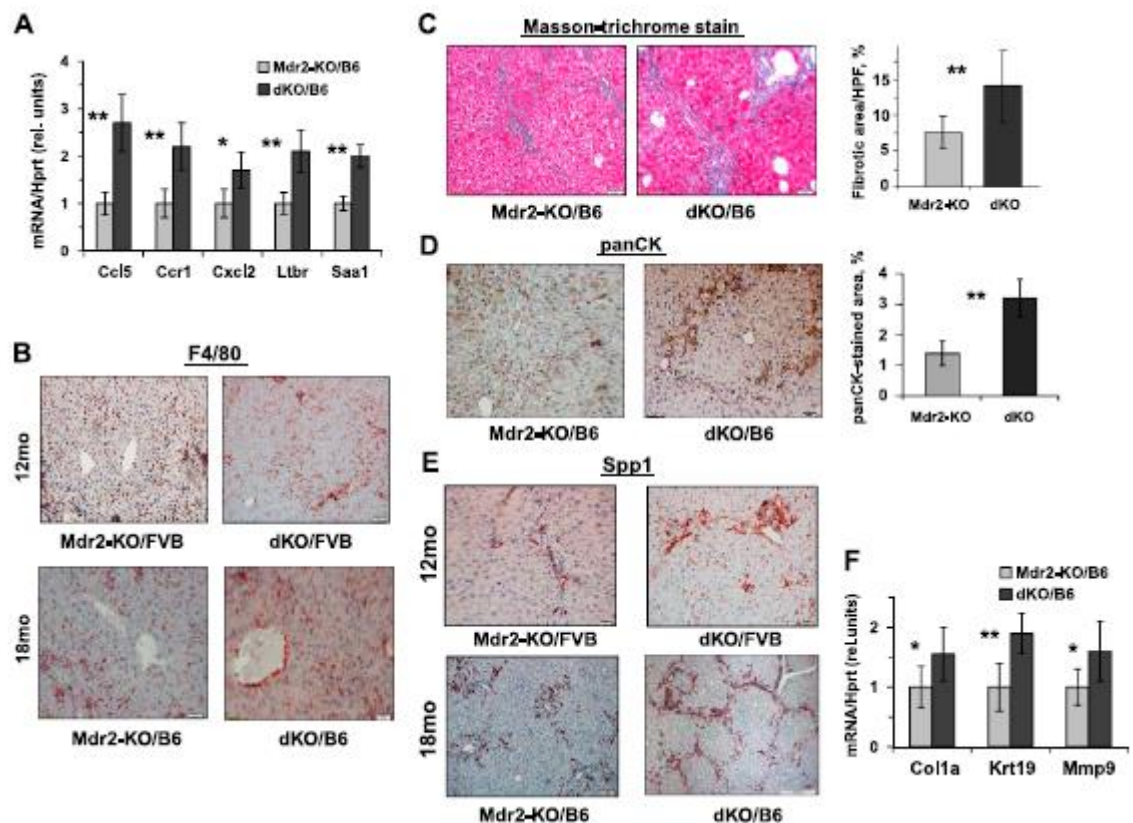
O gene *Spp1* está associado à fibrose, sendo identificado em estudos recentes como polimorfismo rs28354094 no gene da *Opn*, o qual se provou ser um modificador de gene na Distrofia muscular de Duchenne (DMD). A *Opn* existe tanto como um componente da matriz extracelular, como uma molécula solúvel com propriedades de citocina, alguns estudos afirmam que a ausência desta proteína melhora a força muscular de camundongos, enquanto outros apontam que sua participação é necessária para a regeneração muscular (O'REGAN; BERMAM, 2000).

Para elucidar o mecanismo molecular e celular associado ao desenvolvimento acelerado do tumor em camundongos dKO em comparação com Mdr2-KO, foram analisados parâmetros morfológicos, bioquímicos e histológicos dos animais nas idades em que os tumores foram gerados. Na cepa FVB camundongos dKO e machos de Mdr2-KO tiveram níveis semelhantes de atividade ALT aos 12 e 14 meses de idade e um nível semelhante de atividade ALP em 12 meses de idade, enquanto que aos 14 meses, os machos dKO tinham atividade ALP significativamente mais baixa no sangue (POTIKHA et al, 2019).

Os machos FVB dKO na idade de 12 meses também apresentaram maior infiltração de macrófagos e aumento da expressão de *Opn* no fígado (Figura 11 B, E, respectivamente). Na cepa B6, machos dKO tiveram maior atividade ALT no sangue entre 16 e 18 meses, enquanto a atividade sanguínea de ALP em machos dKO e Mdr2-KO foi semelhante. Os camundongos B6 dKO tiveram expressão aumentada de mediadores pró-inflamatórios, incluindo *Ccl5*, *Ccr1*, *Cxcl2*, *Ltbr*, e *Saa1*, e aumento da infiltração de macrófagos no fígado (Figura 11 A-B, respectivamente). Além disso, os

fígados dos camundongos B6 dKO foram caracterizados pela fibrose significativamente aumentada (Figura. 11, C) e hiperplasia biliar intensificada (Figura 11, D), acompanhada por regulação positiva do gene Krt19 (Figura 11, F) e aumento da expressão dos genes associados à fibrose Spp1 (Figura 11, E), Cola1a e Mmp9 (Figura 11, F) (POTIKHA et al, 2019).

Figura 11: RT-qPCR, Imunocoloração, coloração Tricrômica, IHC e expressão de Opn. (A): RT-qPCR de genes relacionados a inflamação; (B): Imunocoloração de monócitos F4/80 e macrófagos de tecidos hepáticos em machos Mdr2-KO e dKO de cepas FVB e B6. (C-E): Coloração tricrômica de Masson e quantificação da área fibrótica por morfometria usando o software ImageJ; (C): IHC para panCK e sua quantificação; (D): Expressão de Opn revelada por imunohistoquímica; (F): RT-PCR quantitativo demonstra expressão aumentada de genes hepáticos.



Fonte: Potikha et al, 2019.

Entre os possíveis mecanismos moleculares que poderiam potencialmente contribuir para o desenvolvimento aprimorado de CHC em camundongos dKO, foi a regulação positiva de Opn (codificado pelo gene Spp1) no fígado não tumoral como um dos fatores mais significativos. Curiosamente, Opn foi super expresso em dKO em comparação com fígado Mdr2-KO (principalmente em colangiócitos) em todas as

idades testadas, porém não há evidências ligando a expressão de Gal-1 e Opn (POTIKHA et al, 2019).

Opn é uma glicoproteína fosforilada ligadora de cálcio, capaz de se ligar às integrinas da superfície celular, sendo isso inicialmente identificada como a principal sialoproteína no tecido ósseo. Ela é expressa constitutivamente em número limitado de tecidos normais, tais como rim, estando também presente em fluidos corporais e abundantemente nos ossos e em tecidos mineralizados. A osteopontina tem sido amplamente discutida no câncer, resposta imune e inflamatória, remodelação vascular, doenças renais, lactação, calcificação e remodelação de tecidos mineralizados. Sendo também ligante de certas formas variantes de CD44 (LEITÃO, 2008).

Dependendo do tipo de lesão e do microambiente associado, Opn pode demonstrar papéis opostos na reparação do fígado e na carcinogênese. Na lesão hepática crônica acompanhada por reação ductular, Opn desencadeia um *crosstalk* entre tecido epitelial e NPC do fígado. Além disso, esta proteína também se liga aos LPSs, reduzindo a disponibilidade de TNF. Nos estágios finais da hepatocarcinogênese, a expressão de Opn está associada com aceleração da progressão tumoral e da metástase e menor sobrevida do paciente (POTIKHA et al, 2019).

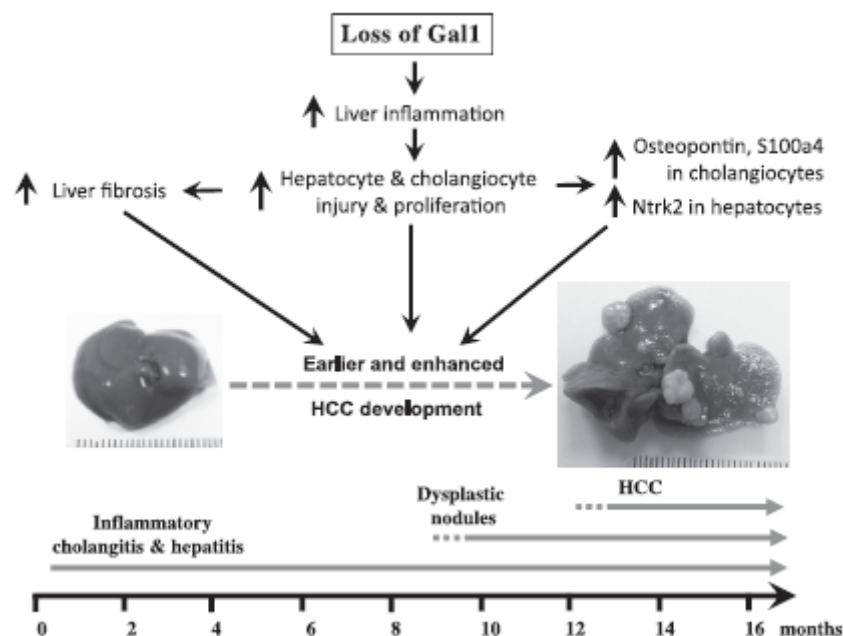
Os autores sugerem que no Mdr2-KO no modelo CHC Opn é induzido em resposta a CLI e este efeito é agravado na ausência de Gal-1. O efeito de Opn no desenvolvimento de HCC em camundongos Mdr2-KO pode ser estágio dependente (semelhante ao de Gal-1), sendo supressor do tumor em um estágio inicial e pró-tumorigênicos em etapas posteriores do CLI. No entanto, o papel da Opn nas fases iniciais do desenvolvimento de CHC ainda não está claro, embora tenha sido proposto para modular a atividade imunossupressora de células supressoras derivadas de mieloides (POTIKHA et al, 2019).

Dessa maneira Gal-1 endógena protege eficientemente o fígado murino de processo inflamatório agudo na cepa B6, mas não na FVB. O acelerado processos de regeneração e remodelação do tecido hepático poderia gerar mais células iniciadoras de tumor (e em um estágio anterior) em dKO em comparação com camundongos Mdr2-KO. Portanto, o efeito pró-tumorigênico associado à perda de Gal-1 aceleraram as fases posteriores da hepatocarcinogênese. Em camundongos com idades

avanzadas não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de tumor no fígado de ambas as cepas (POTIKHA et al, 2019).

Portanto, os resultados demonstram que no Mdr2-KO no modelo de CHC mediado por CLI a perda de Gal-1 exacerba a hepatocarcinogênese, especialmente em camundongos portadores da base genética B6. Este efeito é acompanhado pelo aumento de CLI, fibrose e lesão hepática no início da idade animal, que por sua vez induz múltiplos mecanismos de proteção, incluindo a super expressão das proteínas Opn e S100A4 (Figura 12).

Figura 2: Representação esquemática das consequências de Perda de Gal1 no curso de CLI em ratos Mdr2-KO.



Fonte: Potikha et al, 2019.

5.3 GALECTINA-1 CONTROLA A INFLAMAÇÃO E REMODELAÇÃO VENTRICULAR DURANTE O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

De acordo com Seropian et al (2013) o Infarto agudo do Miocárdio (IAM) está entre as causas mais comuns de morte, apesar das melhorias nas terapias das últimas décadas resultarem na diminuição da mortalidade precoce após IAM, pacientes que sobrevivem a essa condição correm maior risco de desenvolverem Insuficiência cardíaca (IC). Portanto, há uma necessidade de buscar novos tratamentos para melhorar a remodelação cardíaca pós IAM e na prevenção de IC.

Com o objetivo de caracterizar a função e expressão da Gal-1 no coração infartado, Seropian et al (2012), propôs o estudo da interação dessa lectina no modelo de IAM em camundongos e também sua expressão regulada em pacientes com IC. Estudos anteriores (LE et al, 2005) identificaram Gal-1 como parte do transcriptoma regulado por hipóxia e como um dos principais componentes do aparelho contrátil em cardiomiócitos, sugerindo um papel potencial de Gal-1 na modulação da função cardíaca e remodelação pós-infarto.

Para esse estudo foram utilizados ratos com deleção genética do gene que codifica Gal-1 (Lgals-1), camundongos do tipo selvagem da mesma idade e sexo (WT) com fundo genético equivalente (C57BL/6) e camundongo adulto do sexo masculino ICR (CD-1).

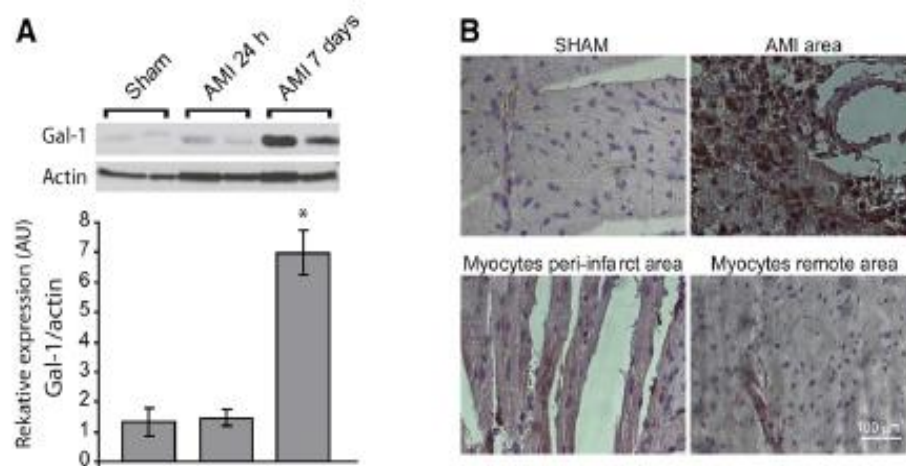
O IAM experimental foi realizado por via coronária onde os camundongos foram intubados por via oro-traqueal sob anestesia (Pentobarbital 70 mg/Kg), sendo submetidos a Toracotomia esquerda, Pericardiectomia e ligadura da artéria coronária. Outra cirurgia simulada foi realizada, porém sem ligadura da artéria coronária. Um grupo adicional de camundongos CD-1 foi submetido à cirurgia de ligadura transitória da artéria coronária por 30 minutos, e em seguida por reperfusão para avaliar os efeitos da Gal-1.

Após a cirurgia os ratos no protocolo de isquemia-reperfusão foram aleatoriamente selecionados para o tratamento com Gal-1 recombinante (rhGal-1) ou solução salina para controle. A rhGal-1 pré-adsorvida foi administrada por via ip em dose única de 3 mg/Kg, 3 minutos antes da reperfusão. Após esse processo foi realizada a Ecocardiografia Doppler, análise de Imunoblot, imuno-histoquímica e imunofluorescência.

Para avaliar a Gal-1 na fisiopatologia cardíaca foi necessário análise da expressão e distribuição dessa lectina endógena no tecido cardíaco de camundongos pós IAM experimental. No IAM experimental sem reperfusão, a expressão cardíaca de Gal-1 não foi alterada 24 horas após a ligadura coronária, porém após 7 dias da cirurgia a expressão de Gal-1 aumentou em sete vezes, em comparação com camundongos sham (Figura 13, A). A Gal-1 foi distribuída principalmente na área peri-infarto, com mínima ou nenhuma coloração no miocárdio remoto e foi expresso principalmente por cardiomiócitos, células mononucleares e com neutrófilos polimorfonucleares infiltrando a região do infarto (Figura 13, B), sugerindo uma regulação dinâmica de Gal-1. Este padrão de expressão aparece em pesquisas

anteriores descrevendo um pico de infiltração de células dendríticas, linfócitos e macrófagos após IAM no mesmo modelo (NAITO et al, 2008; VANDERVELDE et al, 2006).

Figura 13: Regulação da expressão de Gal-1 no coração de camundongo após IAM e no tecido cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca crônica em estágio terminal. (A): Análise de imunotransferência da expressão de Gal-1 no coração de camundongos CD-1 operados de forma simulada ou após IAM experimental. As bandas de proteínas imunorreativas eram semiquantificadas por densitometria e expressos em unidades arbitrárias (AU) em relação à b-actina. (B): Imagens representativas de imunohistoquímica de Gal-1 em coração de camundongo 72 horas após IAM e em camundongos operados com simulação.

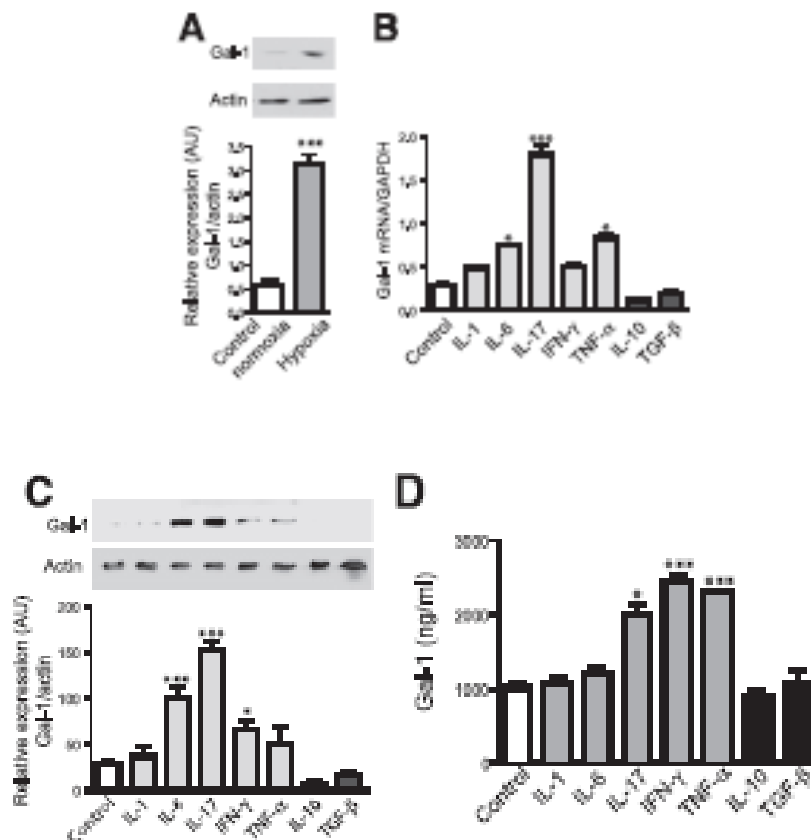


Fonte: Seropian et al, 2012.

Nos ensaios *in vitro* para estudar os efeitos da hipóxia na expressão de Gal-1 em cardiomiócitos, uma célula de murinho adulto denominada HL-1, foi cultivada em meio Claycomb. Após todo o período de incubação as células foram processadas para realização de RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e análise de imunotransferência. Os sobrenadantes foram coletados e a secreção de Gal-1 foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Para avaliar o papel de Gal-1 na apoptose de cardiomiócitos induzidos por hipóxia, células HL-1 foram cultivadas e colocadas em uma câmara incubadora para induzir a hipóxia, e em seguida, incubadas por 18 horas com ou sem rhGal-1 (10 mg/Kg). As células apoptóticas de HL-1 foram transduzidas com retroviral vetor contendo shRNA específico de Gal-1 ou codificado, após 24 horas os cardiomiócitos foram submetidos a hipóxia e ensaio de morte celular.

Por conta da prevalência do quadro de hipóxia em pacientes infartados foi avaliado a expressão de Gal-1 em cardiomiócitos cultivados expostos a hipóxia ou condições normóxicas. A exposição de cardiomiócitos HL-1 à hipóxia resultou em aumento significativamente alto da expressão de Gal-1 em comparação com células cultivadas em condições normais de oxigênio (Gráfico 8, A). Logo após foi avaliado se a expressão de Gal-1 e sua secreção são reguladas de formas diferentes por citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α) e anti-inflamatórias (TGF- β 1, IL-1) em cardiomiócitos. IL-17 foi o estímulo mais potente capaz de fazer a regulação positiva da expressão de Gal-1, tanto no mRNA quanto nos níveis de proteína e aumentando sua secreção pelos cardiomiócitos (Gráfico 8, B-D). A exposição ao TNF- α levou a um considerável aumento na expressão e secreção do mRNA de Gal-1, enquanto a exposição ao IFN- γ não aumentou a transcrição de Gal-1, mas a expressão e secreção da proteína Gal-1 foi substancialmente aumentada (SEROPIAN et al, 2012).

Gráfico 8: Regulação da expressão Gal-1 e função em cardiomiócitos. (A): Análise de imunoblot da expressão de Gal-1 em lisados celulares totais de cardiomiócitos HL-1 expostos a hipóxia ou normóxia condições. (B): RT-qPCR análise da expressão de mRNA de Gal-1 em células HL-1.

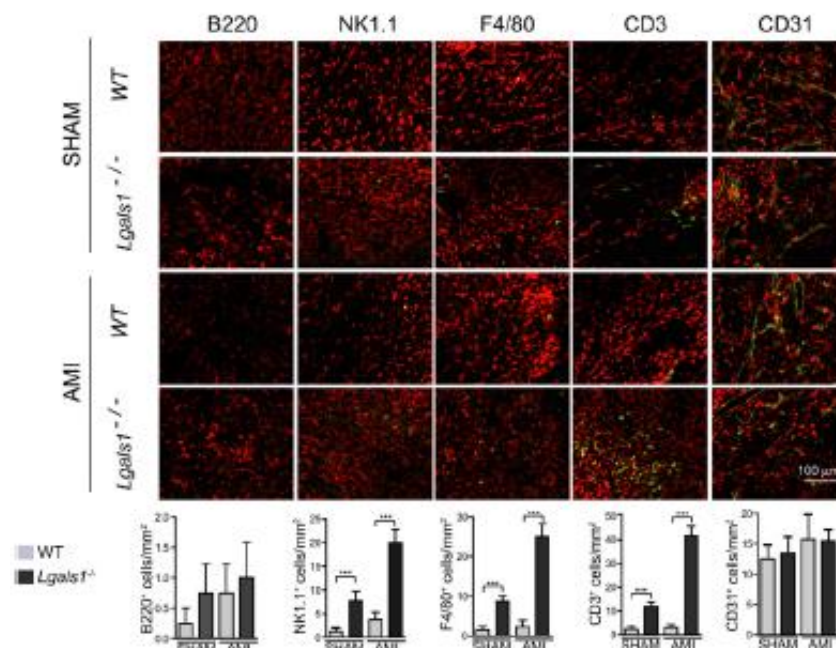


Fonte: Seropian et al, 2012.

Por conta da ampla atividade anti-inflamatória de Gal-1 foi investigada a capacidade desta lectina endógena de controlar infiltrados de células inflamatórias no tecido cardíaco de camundongos *Lgals-1*^{-/-} e WT após IAM e na cirurgia simulada dos animais. Embora camundongos WT sham não tenham apresentado inflamação cardíaca mínima, os animais *Lgals-1*^{-/-} da cirurgia simulada mostraram infiltrados de células inflamatórias proeminentes, composto principalmente de células T CD3⁺, macrófagos F4/80⁺ e células NK1.1⁺ *natural killer* (NK). Notavelmente, a inflamação cardíaca foi ainda mais pronunciada 7 dias após IAM experimental em camundongos *Lgals-1*^{-/-}, mas não em WT (Figura 14) (SEROPIAN et al, 2012).

Portanto, a expressão de Gal-1 foi encontrada em cardiomiócitos e infiltrados inflamatórios na área peri-infarto e foi regulado positivamente em cardiomiócitos expostos a microambientes hipóxicos ou citocinas pró-inflamatórias. Esses estímulos, que representam uma característica de IAM, podem induzir a expressão de Gal-1 para limitar a inflamação do miocárdio, restaurar a homeostase cardíaca e prevenir a remodelação ventricular adversa (SEROPIAN et al, 2012).

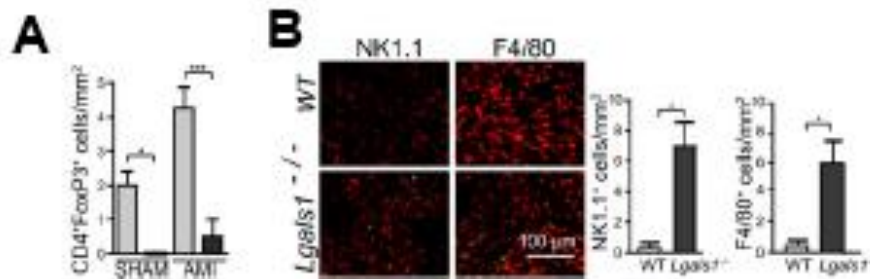
Figura 14: Micrografias confocais a laser do tecido de coração de camundongos *Lgals-1*^{-/-} ou WT 7 dias após IAM ou cirurgia simulada, com quantificação de células números. Os tecidos foram imunocorados para células B (B220), células NK (NK1.1), macrófagos (F4/80), células T (CD3), vasos sanguíneos (CD31) (todos em verde) e iodeto de propídio (vermelho).



Fonte: Seropian et al, 2012.

Além disso, o tecido cardíaco de camundongos *Lgals-1* também mostrou números mais baixos de $CD4^+FoxP3^+$ e de células T regulatórias (Treg), em comparação com camundongos WT sham após IAM experimental (Figura 15 A). Além disso foi evidenciado que, embora em menor extensão, houve um aumento da frequência de intramiocárdio inato de células imunes (macrófagos e células NK) em *Lgals-1*, em comparação com camundongos WT (Figura 15 B), sugerindo que a deficiência de Gal-1 impõe um aumento da predisposição do desenvolvimento de inflamação cardíaca. No entanto, não foi observado alterações histológicas na estrutura miocárdica, nem no colágeno intersticial ou perivascular. Assim, a deficiência de Gal-1 leva ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória cardíaca que é aumentada após IAM resultando em prejuízo na remodelação ventricular (SEROPIAN et al, 2012).

Figura 15: Contagem de células e representação de micróglia. (A): Número de Células Treg $CD4^+FoxP3^+$ no tecido cardíaco de camundongos *Lgals-1* / ou WT, 7 dias após IAM ou cirurgia simulada. (B): Laser representativo em micrografias confocais de tecido cardíaco de *Lgals-1* / ou camundongos WT no início do estudo sem qualquer intervenção, com quantificação do número de células.

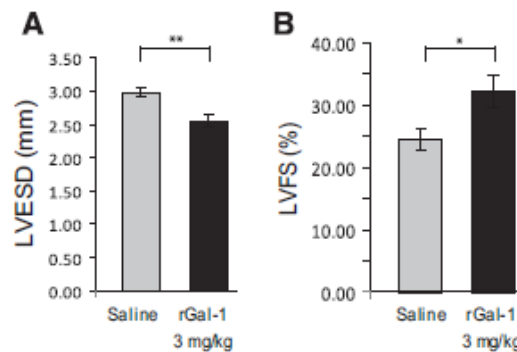


Fonte: Seropian et al, 2012.

Antes da cirurgia, todos os camundongos tinham tamanho ventricular e função sistólica semelhantes. Uma dose única de rhGal-1 (3 mg / kg ip) 3 minutos antes da reperfusão impediu o aumento do ventrículo esquerdo (VE) e manteve a função sistólica preservada, conforme mostrado pela porcentagem do encurtamento fracionário do VE (LVFS), em comparação com camundongos de controle que receberam solução salina (Gráfico 9 A-B). Assim, a administração de rhGal-1 atenua a disfunção do IAM reperfundido, o que sugere um novo alvo molecular para prevenir a insuficiência cardíaca. Porém, é importante ressaltar que embora os resultados destaquem um possível efeito cardioprotetor de Gal-1 através da regulação da

inflamação do miocárdio, é necessário cautela antes da prática clínica, pois esta lectina endógena também pode desencadear outros efeitos biológicos, incluindo agregação plaquetária (PACIENZA et al, 2008).

Gráfico 9: O tratamento com Gal-1 atenua o dano cardíaco em IAM reperfundido em camundongos. Diamêtro sistólico final do VE (LVESD).



Fonte: Seropian et al, 2012.

5.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÊNICAS INDUZIDAS POR GALECTINA-1 E COMBINADAS COM LINFÓCITOS APOPTÓTICOS PROLONGAM A SOBREVIVÊNCIA DO ALOENXERTO NO FÍGADO

Peng et al (2018) descreve células dendríticas (DCs) como apresentadoras de antígenos que desempenham funções essenciais na incompatibilidade dos transplantes. O uso de DCs tolerogênicas (Tol-Dcs) representam uma outra alternativa com o objetivo de melhorar a rejeição pós-transplante. Sabe-se que Gal-1 regula a apoptose de células T ativadas e aumenta a resposta de células Treg, além disso essa proteína ainda possui um papel imunossupressor em DCs. As DCs induzidas por Gal-1 (DCgal-1) promovem a tolerância das células T na neuroinflamação autoimune, enquanto DCs sem Gal-1 induzem a resposta imunogênica. Em estudos anteriores foi evidenciado que ALs alogênicos administrados no doador do órgão prolongam a sobrevivência do aloenxerto cardíaco, pois modificariam a função dos receptores DCs, que após a administração não iriam regular positivamente a secreção de IL-10 e TGF- β por indução das células Treg (SUN et al, 2018).

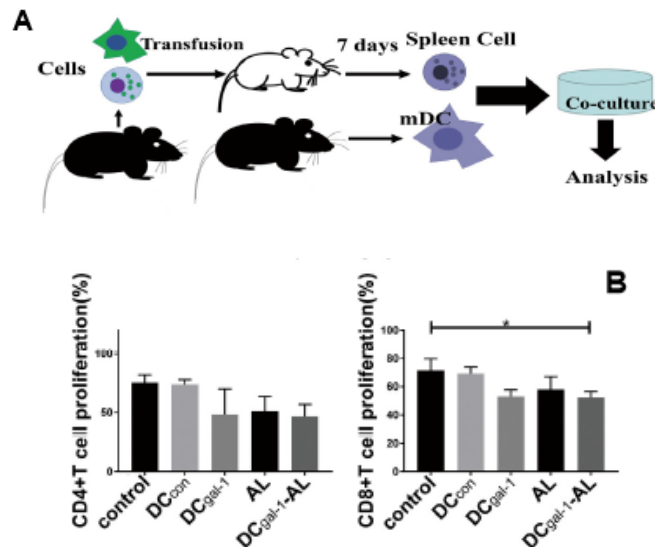
Nesse estudo o objetivo foi avaliar o potencial terapêutico e os possíveis mecanismos de ação das DCs induzidas por Galectina-1 (DCgal-1) derivadas de doadores combinados de linfócitos apoptóticos (AL) na rejeição de transplante de fígado.

Animais machos Dark Agouti (DA) e ratos Lewis foram utilizados nos estudos *in vivo*, onde um modelo de rejeição aguda de transplante ortotípico de fígado foi estabelecido. Nesse ensaio ratos DA foram usados como doadores e ratos Lewis como receptores, que foram divididos em seis grupos: I): o grupo controle recebeu 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS); II): grupo de controle DC (DCcon) que receberam transfusão de 10^6 de DCcon; III): grupo DCgal-1 que recebeu transfusão de 10^6 de DCgal-1; IV): grupo AL, onde receberam 10^7 de transfusão de ALs; V): grupo DCgal-1-AL, que receberam tratamento sinérgico de 10^6 de DC gal-1 e 10^7 de ALs; VI): grupo FK506, que recebeu 5 mg/Kg de FK506 por administração intragástrica todos os dias após o transplante.

Os ratos receptores de grupos de transfusão de células receberam as células ressuspendas em 1 mL de PBS através da veia da cauda, sete dias após o transplante. Cinco receptores de cada grupo foram sacrificados sete dias após o transplante e o fígado, baços e sangue coletados para análise multiplex de citocinas e quimiocinas do soro, também foram realizados testes para obter informações sobre a citometria de fluxo (FCM), reação mista linfocitária (MLR), histopatologia e imuni-histoquímica; oito receptores de cada grupo foram observados quanto à sobrevivência.

Levando esses dados em consideração, Peng et al (2018), propôs investigar o potencial terapêutico e possíveis mecanismos na administração de DCgal-1-AL em doadores de transplante de fígado. Para isso foram avaliadas as consequências da transfusão de DCgal-1-AL em ratos DA e Lewis, as células do baço foram coletadas 7 dias após infusão de células (Figura 16 A). Comparado com PBS, a infusão de DCgal-1-AL diminuiu a proliferação de células T CD8⁺ ($p = 0,043$) (Figura 16 B); além disso, a proliferação de células T CD4⁺ no grupo DCgal-1-AL foi ligeiramente menor do que no grupo controle, embora a diferença não alcance a significância ($p = 0,181$).

Figura 16: Proliferação de células T. (A): Células T marcadas com éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). (B): A proliferação de células T foi determinada por gating no $CD3^+ CD4^+$ ou pela população de linfócitos $CD3^+ CD8^+$ e então submetidos a uma análise estatística (n= 3 em cada grupo).



Fonte: Peng et al, 2018.

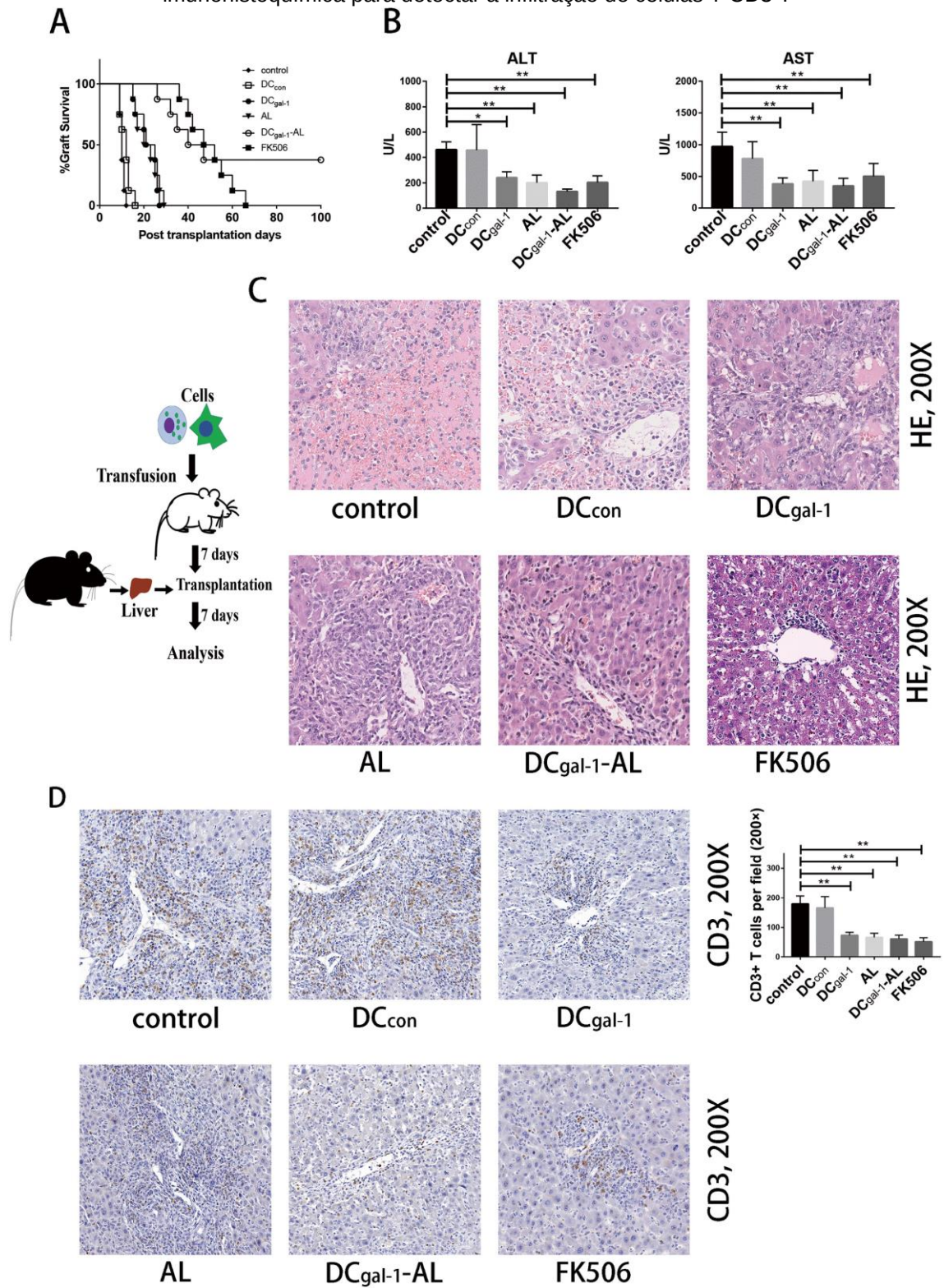
Para avaliar o efeito imunorregulador de DCgal-1s e ALs na sobrevivência do aloenxerto usando um modelo de rejeição aguda no transplante de fígado em ratos DA-Lewis, foi realizado tratamento com PBS ou DCcon antes do transplante, e como controle foi usado tratamento com FK506 após o transplante. Os destinatários do grupo controle e DCcon apresentaram rejeição aguda e morreram em 2 semanas. A transfusão de DCgal-1 ou AL, 7 dias antes do transplante, prolongou significativamente a sobrevivência do aloenxerto em comparação com PBS ($p < 0,01$) (Figura 17 A) (PENG et al, 2018).

Também foi feita transfusão de DCgal-1 combinado com AL em outro grupo de animais. A transfusão combinada prolongou ainda mais o tempo de sobrevivência do receptor (37,5% dos receptores sobreviveram mais que 100 dias), sem diferença significativa em comparação com o tratamento de FK506 (todos morreram em 70 dias) (Figura 20 A). A função do fígado de cada grupo também foi avaliada, com DCgal-1, AL, DCgal-1-AL e FK506 a expressão de ALT e AST reduziram significativamente (Figura 17 B). Sobre as características histopatológicas após as infusões, o grupo controle apresentou infiltração severa de células mononucleares e necrose tecidual generalizada, porém o grau de necrose foi diminuído no grupo DCcon. As transfusões

separadas de DCgal-1 e AL levaram a uma inflamação grave com abundante infiltração celular mononuclear e nenhum sinal de necrose (Figura 17 C) (PENG et al, 2018).

O grupo FK506 manteve uma estrutura de tecido normal com infiltração mínima de células mononucleares (Figura 17 C). Além disso, os tratamentos com DCgal-1-AL e FK506 reduziram significativamente o intra-aloenxerto e infiltração de células T em comparação com PBS (Figura 17 D). Os resultados mostraram que as infusões individuais de DCgal-1 e AL atenuaram significativamente a lesão hepática e prolongaram a sobrevivência do aloenxerto, com o tratamento conjugado DCgal-1-AL essa proteção foi mais exacerbada (PENG et al, 2018).

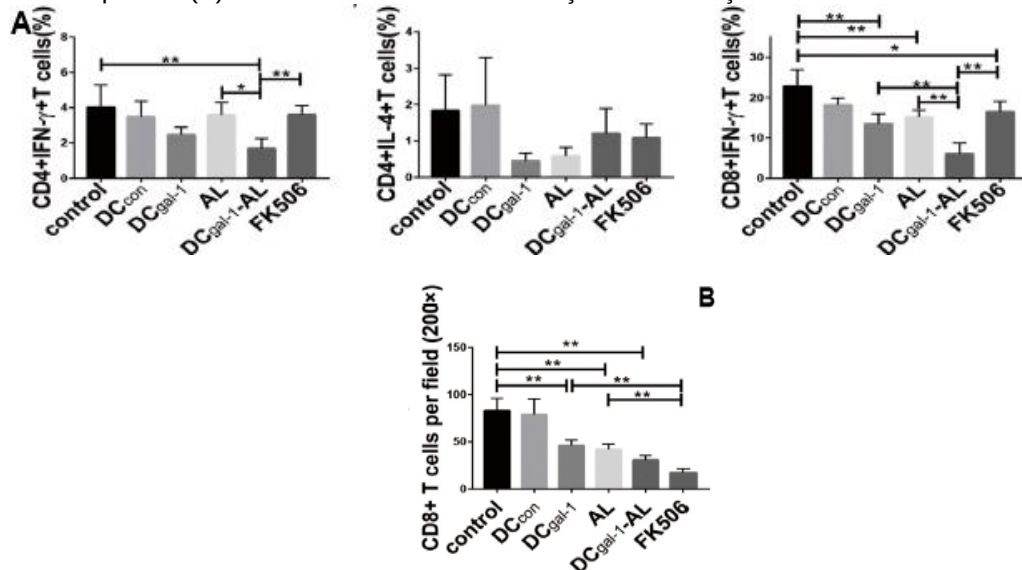
Figura 17: Representação de Curvas de Kaplan-Meier e níveis de função hepática com alterações histopatológicas. (A) Curvas de Kaplan-Meier de sobrevivência do receptor. (B): Os níveis de função hepática. (C): Alterações histopatológicas do fígado em diferentes grupos por coloração com hematoxilina e eosina (HE). (D): Aloenxertos de fígado foram submetidos a coloração imunohistoquímica para detectar a infiltração de células T CD3⁺.



Fonte: Peng et al, 2018.

Foram determinadas as frequências de CD4⁺ IFN- γ ⁺ (Th1), células T CD4⁺ IL-4⁺ (Th2) e CD8⁺ IFN- γ em células do baço. O tratamento com DCgal-1-AL reduziu significativamente os níveis de Th1 em comparação com o tratamento com PBS, AL e FK506. No entanto, os níveis de Th2 não apresentaram nenhuma diferença significativa entre os grupos. Além disso as proporções de células CD8⁺ IFN- γ foram reduzidas pelo DCgal-1, AL, FK506, e DCgal-1-AL (Gráfico 10 A). A infiltração de células T CD8⁺ foi notavelmente reduzida após DCgal-1, AL ou transfusão de DCgal-1-AL (Gráfico 10 B). Além disso, o tratamento com FK506 foi mais eficaz do que DCgal-1 ou AL, anulando a infiltração de células T CD8⁺ (PENG et al, 2018).

Gráfico 10: Gráficos de células do baço. (A): Análise estatística de células do baço 7 dias após transplante. (B): Análise estatística de detecção de infiltração de células T CD8⁺.



Fonte: Peng et al, 2018.

Muitas citocinas e quimiocinas estão envolvidas na proteção do aloenxerto e o meio inflamatório é ideal para aliviar a rejeição, por isso foram avaliados vários fatores inflamatórios no tecido do aloenxerto nos grupos controle, DC-gal-1, AL e DCgal-1-AL. A transfusão com DCgal-1-AL reduziu significativamente os fatores pró-inflamatório IL-2p70, IL-17a, Proteína inflamatória de macrófagos-1a (MIP1a), Proteína quimiotática de macrófago-2 (MIP-2), e Proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1). Avaliações posteriores no soro apresentaram níveis de IL-17a, MIP-1a e RANTES (*Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*) reduzidos nos grupos DCgal-1, AL e DCgal-1-AL. A transfusão de DCgal-1-AL

diminuiu IL-1 β , IFN- γ , MIP-2 e TNF- α , porém aumentou os níveis de IL-10 (PENG et al, 2018).

A RANTES é expressa principalmente por células T e é significativamente correlacionada com a rejeição do aloenxerto. A combinação da redução com esses fatores pró-inflamatórios e o aumento significativo de IL-10 no soro, apoia a hipótese de que o tratamento com DCgal-1-AL regula as células T ativadas no sistema (PENG et al, 2018).

Os receptores de aloenxerto possuem propriedades tolerogênicas intrínsecas que resultam na sua aceitação, os aloenxertos que sobreviveram foram avaliados a longo prazo na ausência de drogas imunossupressoras na análise multiplex de citocinas. Os níveis dos fatores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12p70, MCP-1 e TNF- α , foram significativamente reduzidos nos aloenxertos sobreviventes a longo prazo em comparação com os enxertos de controle, enquanto os níveis de TGF- β 1 e TGF- β 2 estavam acentuadamente aumentados no fígado ($p = 0,036$, $0,015$ vs. controle). Assim, estes fatores podem estar associados à manutenção da tolerância ao transplante e melhorar os resultados do transplante (PENG et al, 2018).

MCP-1 é liberado principalmente pelas células de Kupffer e células estreladas hepáticas (HSCs) no fígado e está envolvida no recrutamento de monócitos durante inflamação/rejeição (YAMADA et al, 2015). A administração de IL-2 em baixa dose ativa Tregs, mas leva à expansão e ativação de células T convencionais e, portanto, não podem promover a sobrevivência do enxerto. A administração em sequência de IL-2 reduz a tolerância induzida ao aloenxerto pela expansão e reativação de células T pró-inflamatórias alorreativas (KAUL et al, 2015). A redução intra-enxerto desses fatores está de acordo com a redução do processo inflamatório. Estes resultados sugerem que o tratamento com DCgal-1-AL exerce de maneira eficaz um efeito anti-inflamatório em monócitos e linfócitos no fígado (PENG et al, 2018).

O TGF- β 1 possui várias funções no processo inflamatório e no transplante. O TGF- β 1 medeia a anergia das células T CD8 $^{+}$ na rejeição do enxerto, o bloqueio de TGF- β 1 regula negativamente a expressão dos receptores inibitórios PD1/PD-L1 em linfócitos CD8 $^{+}$ residentes em tecido. Além disso, o TGF- β 1 foi identificado como um fator de tolerância em um modelo de aloenxerto renal (SMITH et al, 2017). Por outro lado, o conteúdo de TGF- β 1 no fígado está intimamente relacionado com fibrose hepática induzindo a diferenciação de HSC em miofibroblastos. Além disso, foi

documentado que os níveis de TGF- β são positivamente relacionados com a rejeição crônica após o transplante de rim. A neutralização de TGF- β 1 e TGF- β 2 reduz a gravidade do tecido fibroso e da rejeição crônica, e o aumento desses fatores em aloenxertos pode ser associado com a sobrevivência dele a longo prazo (GUAN et al, 2013). Em um dos testes realizados os animais sobreviventes a longo prazo apresentaram nível elevado de Leptina, um hormônio secretado por tecido adiposo que regula a imunidade, apesar do fato da Leptina está associada a inflamação grave, níveis mais elevados de leptina sérica podem estar associados a um menor risco de mortalidade renal nos receptores de transplante e, portanto, melhores resultados posteriores (MOLNAR et al, 2017). Essa condição pode ser justificada pelo fato de que a menor expressão de Leptina pode causar aumento da suscetibilidade a infecções em receptores. Porém os mecanismos detalhados pelos quais o TGF- β 1, TGF- β 2 e a Leptina participam da aceitação do enxerto requerem mais estudos (MATARESE et al, 2002).

A tolerância ao transplante depende da capacidade do aloenxerto de resistir ao dano tecidual. A transfusão de DCgal-1-AL fornece proteção contra rejeição, levando à sobrevivência de mais de 30% dos receptores por 100 dias sem rejeição histológica. Além disso, os receptores que sobreviveram mostraram disfunção do enxerto, mas essa alteração permaneceu estável sem atribuição à rejeição, supondo que a tolerância foi parcialmente estabelecida para os receptores sobreviventes a longo prazo após a transfusão de DCgal-1-AL (PENG et al, 2018).

5.5 TRATAMENTO COM COLÍRIO DE GALECTINA-1 REGULA A DEGRANULAÇÃO DOS MATÓCITOS E ATENUA A GRAVIDADE DA CONJUTIVITE

No estudo de Bosnic et al, (2018), ele propôs avaliar o papel da Gal-1 no tratamento de conjuntivite alérgica (CA). As terapias atuais para essa patologia incluem anti-histamínicos, estabilizadores de membrana de mastócitos, AINES e corticosteroides, sendo esse último o que possui efeitos adversos mais graves, incluindo agravamento da pressão intraocular e catarata. Visto isso, há uma necessidade de busca por novos tratamentos com margem de segurança maior. Como já foi discutido a Gal-1 é presente em várias células relacionadas a resposta inflamatória, especialmente neutrófilos, mastócitos, macrófagos, linfócitos e células

endoteliais, sugerindo um papel fundamental na geração e manutenção da tolerância imunológica.

A conjuntivite foi induzida em ratos Wistar através do composto secretagogo de mastócitos (C48/80), para isso os animais foram distribuídos em grupos de sete a dez animais por tratamento, de acordo com a tabela 3.

Tabela 4: Conjuntivite experimental induzida em ratos e respectivo tratamento.

GRUPOS	OLHO DIREITO (EXPERIMENTAL)	OLHO ESQUERDO (CONTROLE)
I	C48/80 (100 mg/mL)	PBS
II	Gal-1 (0,3 µg/olho) + C48/80 (100 mg/mL)	Gal-1 (0,3 µg/olho) + PBS
III	Gal-1 (3 µg/olho) + C48/80 (100 mg/mL)	Gal-1 (3 µg/olho) + PBS
IV	SCG (40 mg/mL) + C48/80 (100 mg/mL)	SCG (40mg/mL) + PBS

Fonte: Adaptado de Bosnic et al (2008).

A conjuntivite experimental foi induzida no grupo I por aplicação tópica de 20 µl de C48/80 a 100 mg/mL, diluído em PBS no saco conjuntival, como controle o olho esquerdo recebeu apenas PBS. Os grupos II, III e IV receberam uma gota tópica de 20 µl de 0,3, 3 µg/olho de Gal-1 ou 40 mg/mL do estabilizador de mastócitos Cromoglicato de Sódio (SCG), respectivamente, e após 10 minutos foi administrado C48/80 nos grupos experimentais e PBS no controle. Todas as administrações de drogas realizadas nos sacos conjuntivais de ratos foram feitas em animais anestesiado com Cetamina e Xilazina.

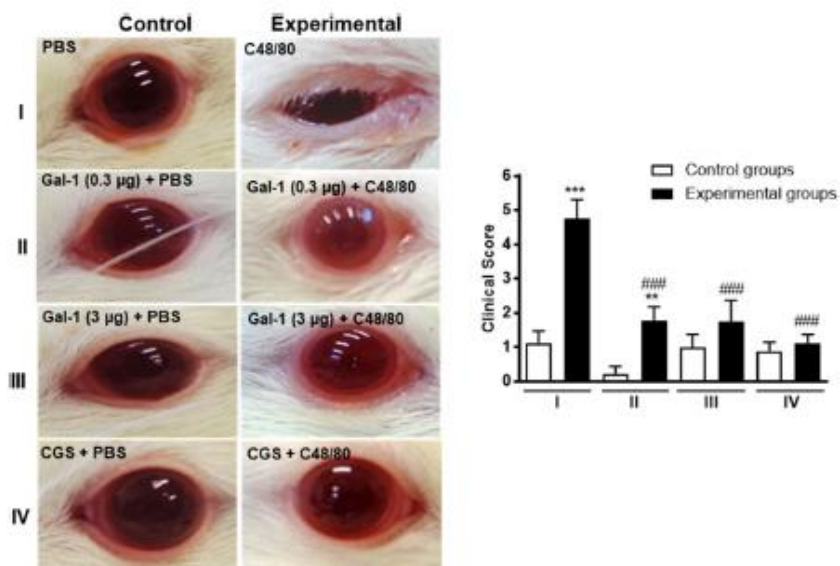
Após 20 minutos da administração de C48/80 os ratos foram examinados clinicamente para verificar a ocorrência e gravidade da conjuntivite. Quatro sinais clínicos foram observados: quemose, hiperemia conjuntival, edema palpebral e lacrimejamento. Foi gerada uma pontuação e cada parâmetro graduado em uma escala de 0 a 3 (0= ausência, 1= leve, 2= sintomas moderados e 3= sintomas graves). Dessa maneira cada animal recebeu uma pontuação total clínica variando de 0 a 12, e os dados representados como média ± erro padrão para cada grupo. Seis horas

após a administração de C48/80 os animais foram sacrificados e olhos e pálpebras recolhidos para testes que avaliam a concentração de histamina (nM) através de imunoensaio. Os animais também passaram por testes que analisam os níveis de citocinas Th1 e Th2, Western Blot, Histopatologia quantificação de células inflamatórias, como leucócitos e mastócitos.

O composto utilizado na indução da CA foi o 48/80 (C48/80), trata-se de um polímero produzido pela condensação de N-metil-pmetoxifenetilamina com formaldeído atuando diretamente na proteína G, produzindo a degranulação de mastócitos, uma das principais células efetoras que contribui para o desenvolvimento do quadro agudo de alergias. A aplicação tópica desse composto é capaz de produzir sinais e sintomas de alergia ocular (coceira, secreção mucosa e quemose) (UDELL; ABELSON, 1981).

A administração do C48/80 induziu uma resposta inflamatória caracterizada por hiperemia conjuntival e edema palpebral intenso, que foi reduzido pelos tratamentos com Gal-1 e SCG. A pontuação confirmou as observações macroscópicas, mostrando uma diminuição significativa nos sinais clínicos nos olhos tratados com Gal-1 e SCG em comparação com os ratos C48/80 não tratados (Figura 18) (BOSNIC et al, 2018).

Figura 18: Pontuação clínica para CA e representação de olhos de ratos observados 20 min após a administração de C48/80 ou PBS.

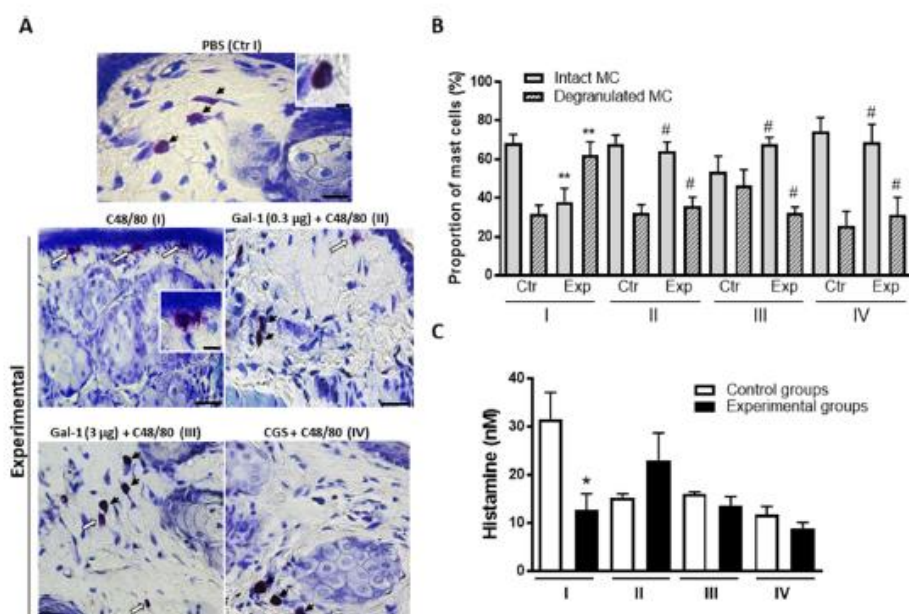


Fonte: Bosnic et al, 2018.

Para confirmar o efeito de C48/80 na ativação de mastócitos foi realizada uma análise histológica de conjuntiva palpebral. Os grupos controle e experimental

apresentaram mastócitos com grânulos citoplasmáticos metacromáticos, determinados pela coloração com azul de toluidina (Figura 19, A). A administração com C48/80 aumentou significativamente a degranulação de mastócitos (62%) em comparação com o respectivo grupo controle (32%) (Figura 19 A-B). Este efeito foi revertido pela aplicação de Gal-1 (0,3 µg e 3 µg) e SCG, que resultou em uma diminuição da degranulação de mastócitos (~ 31-36%) e um aumento nas células intactas (Figura 19 A-B). Estes resultados foram corroborados pelos níveis de histamina nos homogenatos oculares (Figura 19 C). A administração de C48/80 (Exp. I) diminuiu significativamente os níveis de histamina em comparação com o grupo controle I (Figura 19 C). Em contraste, o pré-tratamento tópico com Gal-1 e SCG reverteu este efeito e nenhuma diferença foi detectada entre os grupos experimental e controle II-IV. Curiosamente, homogenatos de olhos dos grupos de controle II-IV (tratados apenas com Gal-1 ou SCG) apresentaram diminuição dos níveis de histamina em relação ao grupo controle I (PBS) (BOSNIC et al, 2018).

Figura 19: Efeito do colírio Gal-1 na desgranulação dos mastócitos e liberação de histamina. (A): Mastócitos intactos (setas pretas), mastócitos degradados (setas brancas). (B): Proporção de mastócitos intactos e desgranulados na conjuntiva palpebral. (C): Análise dos níveis de histamina nos olhos.



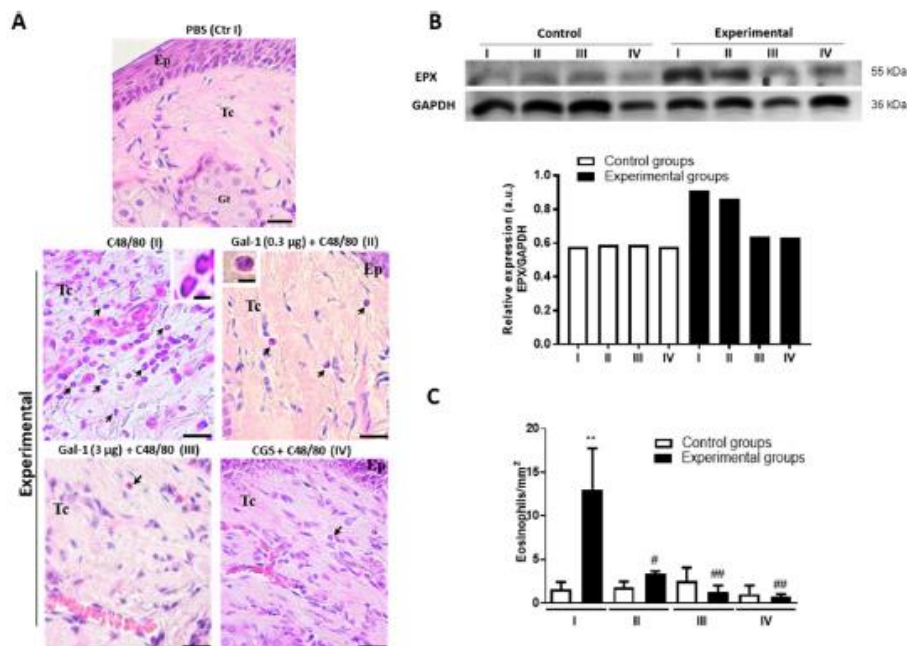
Fonte: Bosnic et al, 2018.

Além da diminuição na degranulação de mastócitos, através da análise histológica das pálpebras dos olhos com C48/80 (Exp. I) foi demonstrada uma resposta inflamatória caracterizada por intenso influxo de eosinófilos (Figura 20 A),

que foi reduzido por colírios Gal-1 e SCG (Exp. II-IV). Além disso, níveis aumentados de eosinófilos peroxidase (EPX) foram detectadas em homogenatos de olhos de animais induzidos com C48/80 (Exp. I) em comparação com os outros grupos experimentais (Figura 20 B). A análise quantitativa de eosinófilos na conjuntiva palpebral confirmou os achados histológicos e de Western blot (Figura 20 C). Os animais com CA induzida por C48/80 (Exp. I) apresentaram aumento acentuado de células em comparação com o controle (grupo I), enquanto que os tratamentos farmacológicos Gal-1 e SCG foram eficazes na redução do influxo de eosinófilos (BOSNIC et al, 2018).

Esses resultados reforçam o papel regulador de Gal-1 na ativação de mastócitos e eosinófilos, e consequente inibição da inflamação ocular. SCG é uma droga anti-inflamatória não esteroidal tradicionalmente descrita como um inibidor da degranulação dos mastócitos, liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios (OWEN et al, 2004).

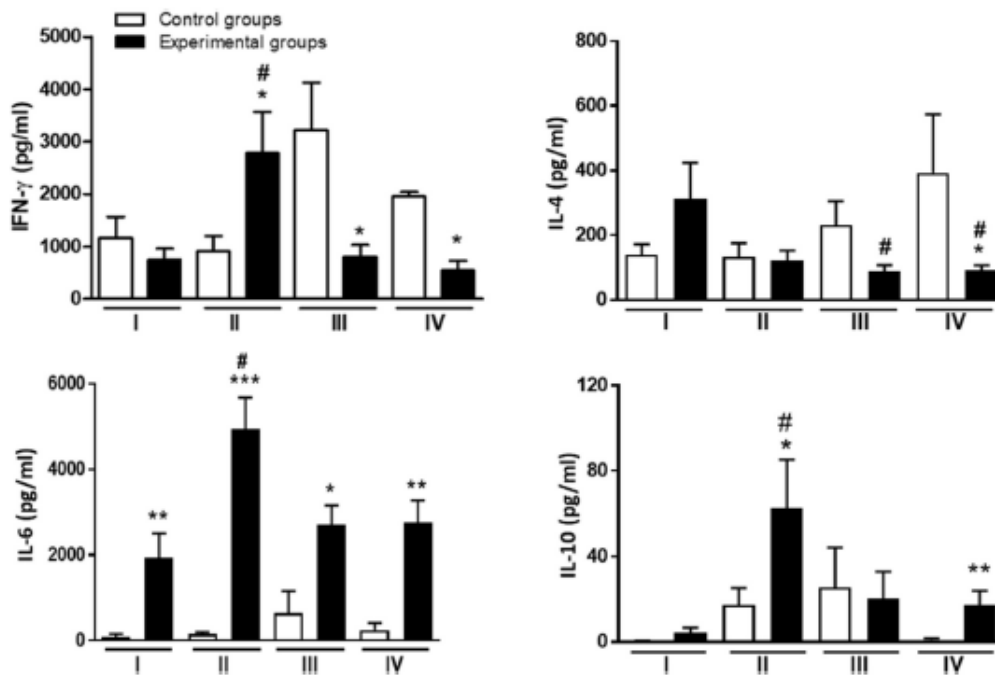
Figura 20: Representação da coloração hematoxilina-eosina nos grupos de animais. (A): Coloração hematoxilina-eosina que apresenta influxo acentuado de eosinófilos (setas) detectado na conjuntiva palpebral 6 h após a administração ocular C48/80 (Exp. I) em comparação com o controle, grupos tratados com Gal-1- e SCG (Exp. II-IV). Epitélio escamoso estratificado (Ep). Tecido conjuntivo frouxo (Tc). Vaso sanguíneo (V). Glândula tarsal (Gt). (B): Expressão de peroxidase de eosinófilos (EPX) em homogenatos de olhos. (C): Quantificação de eosinófilos.



Fonte: Bosnic et al, 2018.

Com o objetivo de verificar o efeito dos tratamentos farmacológicos na produção de citocinas, foi analisado homogenatos de olhos de diferentes condições experimentais. Em baixa concentração (0,3 μg - Exp. II), Gal-1 + C48/80 aumentaram os níveis oculares de IFN- γ , IL-6 e IL-10 em relação aos respectivos grupos controle (II) e C48/80 não tratados (Exp. I) (Gráfico 11). Curiosamente, em alta concentração Gal-1 (3 μg) e SCG (Exp. III e IV, respectivamente) diminuíram os níveis de IFN- γ e IL-4 (Gráfico 11), confirmando seus efeitos anti-inflamatórios locais. Todos os grupos experimentais (I-IV) mostraram um aumento significativo nos níveis de IL-6 em relação aos controles (Gráfico 11) (BOSNIC et al, 2018).

Gráfico 11: Níveis de IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10 em homogenatos de olhos.



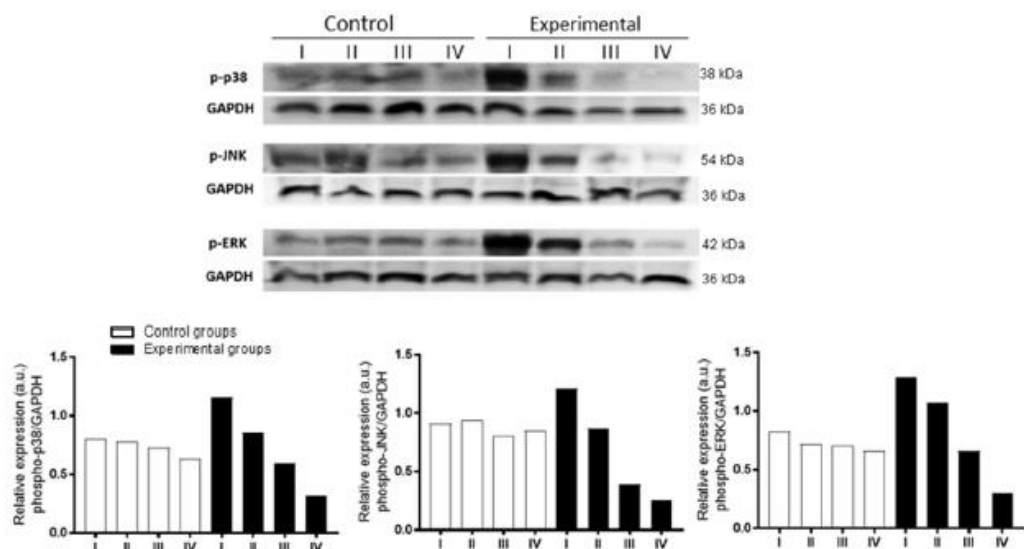
Fonte: Bosnic et al, 2018.

As citocinas IFN- γ e IL-6 podem estimular a ativação de mastócitos (DESAI et al, 2016; YU et al, 2011), enquanto a IL-10 inibe a ativação de mastócitos (BUNDOC; MYERS, 2007). Camundongos deficientes em IFN- γ mostram uma redução significativa nos sinais clínicos de conjuntivite, asma e o influxo de leucócitos para os tecidos em comparação com animais do tipo selvagem. Em ensaios *in vitro* IFN- γ é capaz de ativar mastócitos previamente sensibilizados com IgE, induzindo a liberação de histamina, IL-6 e IL-13 após 1 ou 24 h de administração com antígenos específicos (YU et al, 2011).

Assim, a redução dos níveis de IL-4 pode estar associada com a capacidade da Gal-1 de inibir a degranulação de mastócitos que produzem esta citocina, regulando a resposta de linfócitos Th2 e a produção de IgE ((KOMIYAMA et al, 2014).

Para entender as vias de sinalização envolvidas no tratamento com colírio Gal-1 na CA foi realizado o teste de Western blot, onde foram analisadas a fosforilação de vias ERK, JNK, p38 e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), nos extratos oculares agrupados. Olhos com CA induzida por C48/80 (Exp. I) exibiram níveis aumentados de p38, p-JNK e p-ERK (Gráfico 12) em relação aos seus respectivos grupos controle I. Os tratamentos farmacológicos atenuaram o efeito de C48/80, conforme evidenciado por diminuição da expressão de proteínas quinases fosforiladas, especialmente para Gal-1 a 3 µg e SCG. Como esperado, os grupos de controle I a IV demonstraram imunorreatividade fraca para MAPKs (BOSNIC et al, 2018).

Gráfico 12: Efeito do colírio Gal-1 nos níveis de MAPK no olho homogenatos.



Fonte: Bosnic et al, 2018.

Os resultados mostram que Gal-1 a 3 µg e colírio de SCG produziram uma diminuição pronunciada nos níveis de quinase p38, JNK e ERK fosforilados em homogenatos de olhos em comparação com o grupo C48/80 não tratado. MAPKs são cruciais para induzir a expressão de múltiplos genes que juntos regulam a resposta imunológica (ARTHUR; LEY, 2013), os dados do estudo sugerem que a maior

concentração de colírio Gal-1 é mais eficaz em controlar a resposta inflamatória induzida por C48/80 (BOSNIC et al, 2018).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Gal-1 é uma proteína homodímerica presente em vários tecidos normais ou patológicos, apresentando papel regulador na resposta inflamatória e nocicepção. Nos estudos analisados ficou evidente o potencial terapêutico desta lectina em diversas patologias.

Foi realizada revisão bibliográfica em estudos com testes *in vitro* e *in vivo* a fim de investigar a capacidade de regulação do processo inflamatório e nocicepção, seja no câncer, DP, IAM, transplantes ou CA, em todos os artigos foi possível observar o potencial terapêutico da Gal-1 através dos resultados satisfatórios apresentados, tornando-se assim uma alternativa eficaz nos alvos terapêuticos avaliados. Porém, é preciso cautela antes de avançar para fases clínicas, pois até o momento tem-se poucas informações sobre seus efeitos adversos e dosagens seguras em seres humanos.

Mais estudos conclusivos são necessários para que esta lectina possa ser uma opção terapêutica segura e eficaz.

8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, n. 60, p. 91 – 102, 1995.

ARTHUR, J. S. C.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature reviews immunology*, v. 19, p. 1-14, 2013.

BARLETT, A. A.; LAPP, H. E.; HUNTER, R. G. Epigenetic Mechanisms of the Glucocorticoid Receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 30, n. 11, p. 807 – 818, 2019.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Immunity*, v. 139, p. 267 – 284, 2009.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 2ª. ed., 2002.

BOURNE, S; MACHADO, A.G.; NAGEL, S.J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg Clin*, v. 25, p. 629–638, 2014.

BOSNIC, C. M.; GIMENES, A. D.; OLIANI, S. M.; GIL, C. D. Treatment with galectin-1 eye drops regulates mast cell degranulation and attenuates the severity of conjunctivitis. *European journal of pharmacology*, v. 833, p. 124-130, 2018.

BUNDOC, V. G.; MYERS, A. K.; IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Experimental eye research*, v. 85, p. 575-579, 2007.

CALEJON, D. R. Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos. Universidade de São Paulo, Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto (Tese de doutorado) 2008.

CARVALHO, C.H. F.; CARDOSO, C. F.; ERRANTE, P. R. Aspectos gerais e tratamento farmacológico da artrite reumatoide. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 13, p. 122-132, 2016.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 48, n. 02, p. 137 – 158, 1998.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROSS, L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS*, v. 99, n. 21, p. 13926 – 13931, 2002.

CHERUBINO, P.; PUTTINI, P. S.; ZUCCARO, S. M.; LABIANCA, R. The management of chronic pain in important patient subgroups. *Clin Drug Investig*, v. 32, p. 35 – 44, 2012.

CORREA, S. G.; SOTOMAYOR, C. E.; AOKI, M. P.; MALDONADO, C. A.; RABINOVICH, G. A. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in residente, inflammatory, and activated macrophages. *Glicobiology*, v. 02, p. 28 – 119, 2003.

DESAI, A.; JUNG, M. Y.; OLIVEIRA, A.; GILFILLAN, A. M.; PRUSSIN, C.; KIRSHNBAUM, A. S.; BEAVEN, M. A.; METCALFE, D. D. IL-6 promotes an increase in human mast cell numbers and reactivity through suppression of suppressor of cytokine signaling 3. *Journal of allergy and clinical immunology*, v. 2, p. 1-15, 2016.

Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Controlo da Dor. 2008.

DONG, N.; CHANG, L.; WANG, B.; CHU, L. Retinal neuronal MCP-1 induced by AGEs stimulates TNF- α expression. In rat microglia via p38, ERK, and NFkB pathways. *Biology and genetics in vision research*, v. 20, p. 616-628, 2014.

ELLISON, D.L. Physiology of pain. *Crit Care Nurs Clin*, v. 29, p. 397–406, 2017.

FEIN, A. Nociceptors and the perception of pain. 2014.

FILIPPIN, F. B.; REIS, K.; CEMIN, L.; DUZZIONI, M.; HERMES, E. M.; SOUZA, L. C.; Novo intervalo de referência para Alanina aminotransferase usando o sistema automatizado de bioquímica Dade Behring Ar Dimension. News Lab, v. 65, p. 148-160, 2004.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. The new England Journal of Medicine, v. 345, n. 06, p. 433 – 442, 2001.

FONG, A.; SCHUG, A.A. Pathophysiology of pain: A practical primer. Journal PRS, v. 134, p. 8S-14S.

GIL, C. D.; COOPER, D.; ROSIGNOLI, G.; PERRETTI, M.; OLIANI S. M. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. Inflammation Research, v. 55, p. 99 – 107, 2006.

GOMES, P. O. M. Imobilização de galectina-1 e galectina-1 fusionada com Maltose Binding Protein (MBP-Gal-1) sobre superfície Eletropolimerizada com [N-(3-Pirrol-1-il-Propil) -4,4'-bipiridina] (PPB) para a construção de um Biossensor de Lactose. Departamento de química da Universidade de São Paulo (Tese de Doutorado), 2018.

GOULART, F; SANTOS, C. C.; SALMELA, L. F. T; CARDOSO, F. Análise do desempenho funcional em pacientes portadores de doença de Parkinson. Acta fisiátrica v. 11, n. 1, p. 12-16, 2004.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms and consequences. Cell press, v. 51, p. 27 – 41, 2019.

GUAN, Q.; LI, S.; GAO, S.; CHEN, H.; NGUA, C. Y. C.; DU, C. Reduction of chronic rejection of renal allografts by anti-transforming growth factor- β antibody therapy in a rat model. American journal of physiology – renal physiology, v. 305, p. 199-207, 2013.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *TINS*, v. 20, n. 02, p. 78 – 84, 1997.

HOLTMAN, I. R.; SKOLA, D.; GLASS, C. K. Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *The journal of clinical investigation*, v. 9, p. 3220-3229, 2017.

JIANG, Y.; LU, Y.; JIANG, X.; HU, J.; LI, R.; LIU, Y.; ZHU, G.; RONG, X. Glucocorticoids induce osteoporosis mediated by glucocorticoid receptor-dependent and -independent pathways. *Biomedicine and pharmacotherapy*, v. 125, p. 1 – 9, 2020.

JIN, J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of medications commonly used to treat pain and inflammation. *Jama Patient Page*, v. 314, p. 1084, 2015.

JOE, E. H.; CHOI, D. J.; AN, J.; EUN, J. H.; JOU, I.; PARK, S. Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology*, v. 2, p. 77-87, 2018.

KASHMIRA, P.; DHANESHWAR, S.; SHAKUNTALA, C.; POORVSHREE. Design, synthesis and *in vitro* release studies of co-drugs for rheumatoid arthritis. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 14, p. 47-52, 2015.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. *Farmacologia Básica e Clínica*. 12^a ed. McGraw-Hill, 2014.

KAUL, A. M. K.; GOPARAJU, S.; DIVORINA, N.; LIDA, S.; KESLAR, K. S.; MOTTE, C. A.; VALUJS, A.; FAIRCHILD, R. L.; BALDWIN, W. M. Acute and chronic rejection: compartmentalization and kinetics of counterbalancing signals in cardiac transplants. *American journal of transplantation*, v. 15, p. 333-345, 2015.

KAUR, D.; SHARMA, V.; DESHMUKH, R. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 2019.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patologia da dor. Archives of Veterinary Science, v. 13, n. 1, p. 1 – 12, 2008.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. Physiology of Pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Philadelphia:Saunders, v.30, n.4, p. 703-728, 2000.

LE, Q. T.; SHI, G.; CAO, H.; NELSON, D. W.; WANG, Y.; CHEN, E. Y.; ZHAO, S.; KONG, C.; RICHARDSON, D.; O'BYRNE, K. J.; GIACCIA, A. J.; KOONG, A. C. Galectin-1: A link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. Journal of clinical oncology, v. 23, n. 35, p. 8932-8941, 2005.

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and physiology. Clinics and plastic surgery, 2019.

LEFFER, H.; CARLSSON, C; HEDLUND, M; QIAN, W; POIRIER, F. Introduction to galectins. Glycoconjugate Journal, v. 19, p. 433-440, 2004.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, 2014.

LEITÃO, G. M. Osteopontina como marcador de resposta à radioterapia e quimioterapia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço levemente avançado. Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (Tese de mestrado), 2008.

LI, Y.; CHEN, N.; WU, C.; LU, Y.; GAO, G.; DUAN, C.; YANG, W.; LU, L. Galectin-1 attenuates neurodegeneration in Parkinson's disease model by modulating microglial MAPK/IkB/NFkB axis through its Carbohydrate-recognition domain. Brain, Behavior, and Immunity, v. 83, p. 214-225, 2019.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. Annals of the New York Academy of Sciences, p. 82-158, 2010.

MACHADO, T. C. Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas. Instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo (Tese de doutorado), 2014.

MATARESE, G.; CAVA, A. L.; SANNA, V.; LORD, G. M.; LECHLER, R. I.; FONTANA, S.; ZAPPACOSTA, S. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends in immunology*, v. 23, p. 182-187, 2002.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? *Anaesthesist*, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. *Progress in neurobiology*, v. 57, p. 1 – 164, 1999.

MIRANDA, C.C.V.; JUNIOR, L.F.S.; PELLOSO, L.R.C.A. New physiological classification of pains: current concept of neuropathic pain. *Revista Dor*, v. 17, p. 2-4, 2016.

MOLNAR, M. Z.; NAGY, K.; REMPORT, A.; GAIPOV, A.; FULOP, T.; CZIRA, M. E.; KOVESDY, C. P.; MUCSI, I.; MATHE, Z. Association between serum leptin level and mortality in kidney transplant recipients. *Journal of renal nutrition*, p. 1-9, 2016.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). *Temas de reumatologia clínica*, v. 09, n. 02, p. 53 – 63, 2008.

NAITO, K.; ANZAI, T.; SUGANO, Y.; MAEKAWA, Y.; KOHNO, T.; YOSHIKAWA, T.; MATSUNO, K.; OGAWA, S. Differential effects of GM-CSF and G-CSF on infiltration of dendritic cell during early left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Journal Immunology*, v. 181, p. 5691-5701, 2008.

NASEF, N. A.; MEHTA, S.; FERGUSON, L. R. Susceptibility to chronic inflammation: an update. *Arch Toxicol*, v. 91, p. 1131–1141, 2017.

NICKEL, W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*, v. 06, p. 607 – 614, 2005.

O'REGAN, A.; BERMAM, J. S. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *International journal experimental pathology*, v. 81, n. 6, p. 337-390, 2000.

OTIS, J. D.; FLOR, H.; TURK, D. C. Chronic pain: Na integrated biobehavioral approach Seattle. *Cognitive and behavioral practice*, v. 1, p. 8-117, 2013.

OWEN, C. G.; SHAH, A.; HENSHAW, K.; SMEETH, L.; SHEIKH, A. Topical treatments for seasonal allergic conjunctivitis: systematic review and meta-analysis of efficacy and effectiveness. *The british journal of general practice: The journal of the royal college of general practitioners*, v. 54, p. 451-456, 2004.

PACIENZA, N.; POZNER, R. G.; BIANCO, G. A.; D'ATRIP, L. P.; CROCI, D.O.; NEGROTTA, S.; MALAVER, E.; GÓMEZ, R. M.; RABINOVICH, G. A.; SCHATTNER, M.; The immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 triggers human platelet activation. *Journal Faseb*, v. 22, p. 1113-1123, 2008.

PARK, J. G.; YI, Y. S.; HONG, Y. H.; YOO, S.; HAN, S. Y.; KIM, E.; JEONG, S. G.; ARAVINTHAN, A.; BAIK, K. S.; CHOI, S. Y.; SON, Y. J.; KIM, J. H.; CHO, J. Y. Tabetri™ (Tabebuia avellanae Ethanol Extract) ameliorates osteoarthritis symptoms induced by Monoiodoacetate through its anti-inflammatory and chondroprotective activities. *Hindawi, mediators of inflammation*, p. 1 – 14, 2017.

PENG, Y.; YE, Y.; JIA, J.; HE, Y.; YANG, Z.; ZHU, X.; HUANG, H.; WANG, W.; GENG, L.; YIN, S.; ZHOU, L.; ZHENG, S. Galectin-1-induced tolerogenic dendritic cells combined with apoptotic lymphocytes prolong liver allograft survival. *International immunopharmacology*, v. 65, p. 470-482, 2018.

PENHA, M. A. P. Um modelo de comportamento aversivo térmico em *Megalobulimos oblungus* e a ação de fármacos nos sistemas opioide e serotoninérgico envolvidos na nocicepção, Programa de pós-graduação em neurociências, 2001.

PEREIRA, E. M. Avaliação do papel de receptores NMDA para o glutamato na nocicepção orofacial aguda e crônica em ratos. Programa de pós-graduação do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2006.

POTIKHA, T.; STOYANOV, E.; PAPPO, O.; FROLOV, A.; MIZRAHI, L.; OLAM, D.; PERLMAN, T. S.; WEISS, I.; BARASHI, N.; PELED, A.; SASS, G.; TIEGS, G.; POIRIER, F.; RABINOVICH, G. A.; GALUN, E.; GOLDENBERG, D. Interstrain differences in chronic hepatitis and tumor development in a murine model of inflammation- mediated hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, v. 58, n. 1, p. 192-204, 2013.

POTIKHA, T. PAPPO, O.; MIZHARI, L.; OLAM, D.; MALLER, S. M.; RABINOVICH, G. A.; GALUN, E.; GOLDENBERG, D. S. Lack of galectin-1 exacerbates chronic hepatitis, liver fibrosis, and carcinogenesis in murine hepatocellular carcinoma model. *The FASEB journal*, v. 19, p. 1-13, 2019.

RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Regulatory circuits mediated by Lectin-glycan interactions in autoimmunity and câncer. *Immunity*, v. 36, p. 322 – 335, 2012.

RABINOVICH, G. A.; DALY, G.; DREJA, H.; TAILOR, H.; RIERA, C. M.; HIRABAYASHI, J.; CHERNAJOVSKU, Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress Collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *Journal of experimental medicine*, v. 190, n. 03, p. 385 – 397, 1999.

RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; MATAR, P.; ROZADOS, V.; GERVASONI, S.; SCHAROVSKY G. O. The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. *Cancer Immunol Immunother* v. 50, p. 597 – 603, 2002.

RABINOVICH, G. A.; SOTOMAYOR, C. E.; RIERA, C. M.; BIANCO, I.; CORREA, S. G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *European journal of immunology*, v. 30, p. 1131 – 1339, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 9ª ed. Elsevier, 2020.

RELLAND, L. M.; GEHRED, A.; MAITRE, N. L. Behavioral and physiological signs for pain assessment in preterm and term neonates during a nociception-specific response: A systematic review. *Pediatric neurology*, 2018.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Journal of the american heart association*, v. 31, p. 986 – 1000, 2011.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D.V. Association of inflammatory mediators with pain perception. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 96, p. 1445-1452, 2017.

SALDANHA, A. A.; SIQUEIRA, J. M.; CASTRO, A. H. F.; MATOS, N. A.; KLEIN, A.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; SOARES, A. C. Peripheral and central antinociceptive effects of the butanolic fraction of *Byrsonima verbascifolia* leaves on nociception-induced models in mice. *Inflammopharmacol*, v. 25, p. 81-90, 2017.

SEROPIAN, I. M.; CERLIANI, J. P.; TOLDO, S.; TASSELL, B. W. V.; ILARREGUI, J. M.; GONZALES, G. E.; MATOSO, M.; SALLOUM, F. N.; MELCHIOR, R.; GELPI, R. J.; STUPIRSK, J. C.; BENATAR, A.; GOMEZ, K. A.; MORALES, C.; ABBATE, A.; RABINOVICH, G. A. Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. *The american journal of pathology*, p. 1-12, 2012.

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química nova*, v. 32, 2009.

SILVA, C. M. S.; VIEIRA-JUNIOR, R. C.; TROMBETA, J. C. R.; LIMA, T. R.; FRAGA, G. A.; SENA, M. S.; ÁVILA, E. T. P.; TIBANA, R. A.; PRESTES, J.; NAVALTA, J. W.; VOLTARELLI, F. A. Effects of aerobic and resistance training of long duration on proand anti-inflammatory cytokines in rats. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, v. 10, p. 170-175, 2017.

SMITH, R. N.; MATSUNAMI, M.; ADAM, B. A.; ROSALES, I. A.; OURA, T.; COSIMI, A. B.; KAWAI, T.; MENGEL, M.; COLVIN, R. B. RNA expression. profiling of nonhuman primate renal allograft rejection identifies tolerance. *American journal of transplantation*, v. 18, p. 1328-1339, 2018.

SUN, E.; GAO, Y.; CHEN, J.; ROBERTS, A. I.; WANG, X.; CHEN, Z.; SHI, Y. Allograft tolerance induced by donor apoptotic lymphocytes requires phagocytosis in the recipient. *Cell death e differentiation*, v. 11, p. 1258-1264, 2004.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. p. 399-402, 2004.

UDELL, I. J.; ABELSON, M. B. Animal and human ocular surface response to a topical nonimmune mast-cell degranulating agent (compound 48/80). *American journal of Ophthalmology*, v. 91, p. 226-230, 1981.

VANDERVELDE, S.; VAN, A. V. M. J.; TIO, R. A.; PETRESEN, A. H.; LUYN, M.J.; HARMSSEN, M. C. Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. Non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovascular pathology*, v. 15, p. 83-90, 2006.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. Essencial of glicobiology. Cold spring harbor laboratory press, 1999.

VASCONCELOS, F. H.; ARAÚJO, G. C. Prevalência de dor crônica no Brasil: estudo descritivo. *Br. J. Pain*, v. 2, p. 176 – 179, 2018.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. *Semiologia e fisiopatologia clínicas: capítulo I*, v. 27, n. 1/2, p. 7 – 48, 1994.

WENG, H. R.; LEE, J. I.; LENZ, F. A.; SCHWARTZ, A.; VIERCK, C.; ROWLAND, L.; DOUGHERTY, P. M. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. *Neuroscience*, v. 101, p. 393-401, 2000.

YAMADA, Y.; NADAZDIN, O.; BOSKOVIC, S.; LEE, S.; ZORN, E.; SMITH, R. N.; COLVIN, R. B.; MADSEN, J. C.; COSIMI, A. B.; KAWAI, T.; BENICHO, G. Repeated injections of IL-2 break renal allograft tolerance induced via mixed hematopoietic chimerism in monkeys. *American journal of transplantation*, v. 15, p. 3055, 3066, 2015.

YU, M.; EKART, M. R.; MORGAN, A. A.; MUKAI, A.; BUTTE, A. J.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Identification on an IFN- γ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *The journal of clinical investigation*, v. 121, p. 3133-3143, 2011.

ZORINA-LICHTENWALTER, K.; KHOURY, C.B.M.S.; DIATCHENKO, L. Genetic predictors of human chronic pain conditions. *Neuroscience*, v. 338, p. 36–62, 2016.