UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena,
sobre funções de neutrófilos

Lílian Cataldi Rodrigues

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena,
sobre funções de neutrófilos

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientada: Lílian Cataldi Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias
Baruffi

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodrigues, Lílian Cataldi

Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena, sobre funções de neutrófilos

99p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Dias-Baruffi, Marcelo

1. Galectina-1. 2. Neutrófilos. 3. Metabolismo oxidativo. 4. Sepse Polimicrobiana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lílian Cataldi Rodrigues

Título do trabalho: Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena, sobre funções de neutrófilos

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A minha família e aos meus pais que iluminaram meu caminho com afeto e dedicação para que eu o trilhasse sem medo e cheia de esperanças! Pai e Mãe:

meu eterno amor e gratidão!

Ao meu noivo Idelberto Matias Junior pelo amor, por apoiar e compreender a importância deste trabalho na minha vida!"

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me proteger e centralizar.
- Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi que apostou na minha capacidade, abrindo as portas de seu laboratório para que eu pudesse aprender além da pesquisa, a ter a paciência e a perseverança de um pesquisador. Obrigado pela amizade sincera construída ao longo destes anos.
- Agradeço a equipe do Laboratório de Glicoimunologia da FCFRP-USP, a todos vocês que contribuíram para a realização deste trabalho, pela assistência técnica e pelo convívio agradável ao longo desses anos.
- A equipe do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP, em especial a Luciana Kabeya pela dedicação nos experimentos, pela ajuda imprescindível para realização deste trabalho.
- A equipe do Laboratório de Citologia Clínica da FCFRP-USP e a Profa. Dra. Maria Regina Torqueti pela utilização de seu laboratório e pela amizade, apoio e compreensão.
- A equipe do Laboratório de Inflamação da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, pelo auxílio nos experimentos envolvendo o modelo de sepse em animal.
- A equipe da Secretaria de Pós-Graduação da FCFRP-USP
- A equipe do Biotério da FCFRP-USP
- A CAPES (Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro incluindo a bolsa de Doutorado.
- Aos amigos e a todos que de alguma forma me ajudaram a crescer, fizeram parte da minha vida em algum momento, mesmo que breve!.

*“Depois de algum tempo você aprende....
Que somos responsáveis por nós mesmos e que não se deve comparar com os
outros, mas com o melhor que pode ser;
Que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo
é curto;
Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do
amanhã é incerto demais para os planos;
E que não importa onde já chegou, mas onde está indo;
E que maturidade tem a ver com os tipos de experiência que se teve e o que
você aprendeu com elas;
Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que
não se pode mais;
E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!..”*

William Shakespear

RESUMO

Rodrigues, L. C. **Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena, sobre funções de neutrófilos.** 2012. 99f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A galectina-1 (Gal-1) é uma lectina que reconhece β -galactosídeos e participa de vários processos biológicos, incluindo a modulação da resposta inflamatória. Dados da literatura mostram a participação desta lectina na indução da exposição de fosfatidilserina (FS - um marcador de apoptose), na geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) e na modulação quimiotática de neutrófilos. Entretanto, ainda são escassos os dados relacionados ao impacto biológico da Gal-1, exógena e endógena, sobre a biologia destas células. Neste trabalho foram avaliados, *in vitro*, alguns aspectos funcionais da interação Gal-1/neutrófilo. Determinou-se o nível de expressão da Gal-1 (*Western Blotting*) e de seu mRNA (*PCR real time*), em leucócitos humanos obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis e em células da linhagem promielocítica humana (HL-60). Leucócitos do sangue periférico e células HL-60 não expressam níveis detectáveis da proteína e também do mRNA para Gal-1. Por meio de ensaios de quimiluminescência (QL) foi possível analisar a capacidade da Gal-1 recombinante humana de induzir e modular a produção de EROs em neutrófilos humanos não ativados e ativados com fMLP (*n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*). A Gal-1 induz a produção de EROs de modo dose-dependente em neutrófilos ativados com fMLP. Entretanto, em neutrófilos não ativados esta lectina não induz o metabolismo oxidativo e, além disso, é capaz de modular negativamente a produção de EROs em resposta ao fMLP. Tanto nas células não ativadas quanto ativadas com fMLP, os efeitos da Gal-1 na produção de EROs estão parcialmente associados a sua propriedade lectínica. Na literatura ainda não há relatos sobre a interferência da Gal-1 no metabolismo oxidativo em neutrófilos ativados com repetidas doses de fMLP. Sabe-se que o tratamento sucessivo com fMLP reduz os níveis de produção de EROs por neutrófilos, no entanto, a presença de Gal-1 não interferiu neste processo. Interessantemente, neutrófilos recuperados do peritônio de camundongos Gal-1^{-/-} liberam mais EROs em resposta ao fMLP e a Gal-1 exógena quando comparado aos neutrófilos de animais selvagens. Com base nos achados *in vitro* e sabendo que na sepse polimicrobiana o neutrófilo desempenha um papel importante, o próximo passo foi utilizar o modelo de M-CLP (sepse moderada) em camundongos destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da Gal-1. Animais Gal-1^{-/-}, apresentam menor taxa de sobrevivência. O influxo de neutrófilos e a carga bacteriana no peritônio são maiores nos animais Gal-1^{-/-} apesar da menor quantidade de bactérias detectadas no sangue, em relação aos animais selvagens. No pulmão, o influxo de neutrófilos é semelhante para ambos os grupos. No entanto, após a injeção intraperitoneal de 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, camundongos Gal-1^{-/-} apresentam maior atividade bactericida no lavado peritoneal e sangue, em relação aos selvagens. A participação da Gal-1 na homeostase de neutrófilos foi demonstrada *in vitro*, por citometria de fluxo (anexina-V-FITC), onde a indução de FS nos neutrófilos tratados com Gal-1 favoreceu a fagocitose destas células por macrófagos. Portanto, este conjunto de resultados sugere que a Gal-1, exógena ou endógena, pode modular funções imunológicas de neutrófilos e participar da regulação do processo inflamatório/infeccioso sistêmico. Palavras-chave: 1. Galectina-1. 2. Neutrófilos. 3. Metabolismo oxidativo. 4. Sepse Polimicrobiana.

ABSTRACT

Rodrigues, L. C. **Evaluation of the biological impact of Galectin-1, endogenous and exogenous, on neutrophil functions.** 2012. 99f. Thesis (Ph.D.). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Galectin-1 (Gal-1) is a lectin that recognizes β -galactosides and participates in biological processes, including modulation of the inflammatory response. Literature data show the involvement of this lectin to induce exposure of phosphatidylserine (PS - a marker of apoptosis), in the generation of reactive oxygen species (ROS) and in modulation of neutrophil chemotaxis. However, there are few data related to the biological impact of exogenous and endogenous Gal-1 on the biology of these cells. This study evaluated, *in vitro*, some functional aspects of the interaction of Gal-1 and neutrophil. It was determined the expression level of Gal-1 (Western blotting) and its mRNA (real time PCR) on human leukocytes obtained from peripheral blood of healthy donors and human promyelocytic cell line (HL-60). Peripheral blood leukocytes and HL-60 cells do not express detectable levels of this protein as well as the Gal-1 mRNA. Through chemiluminescence testing (CL) it was possible to analyze the ability of recombinant human Gal-1 to induce and modulate the production of ROS in naïve and activated (n-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-fMLP) human neutrophils. Gal-1 induces ROS production in a dose-dependent way in fMLP activated neutrophils. However, in naïve neutrophils this lectin does not induce oxidative stress and can negatively modulate ROS production in response to fMLP. The effects of Gal-1 on ROS production in both non-activated cells and activated cells are partially associated with their lectin property. In the literature there are no data about the interference of Gal-1 on ROS production in activated neutrophils with repeated doses of fMLP. It is known that the subsequent treatment with fMLP reduced levels of ROS production by neutrophils; however, the presence of Gal-1 did not affect this process. Interestingly, peritoneum neutrophils from Gal-1^{-/-} mice release more ROS in response to fMLP and exogenous Gal-1 when compared to neutrophils from wild type animals. Based on the *in vitro* findings and considering that in polymicrobial sepsis, neutrophils play an important role, the next step was to use the M-CLP model (moderate sepsis) in mice lacking (Gal-1^{-/-}) or not (Gal-1^{+/+}) Gal-1 gene. Gal-1^{-/-} animals present lower survival rate and fewer bacteria in the blood despite having higher bacterial load in infectious focus in relation to wild type mice. The rates of neutrophils influx into the peritoneum and lungs are similar for both groups. The participation of Gal-1 in the homeostasis of neutrophils was demonstrated *in vitro* by flow cytometry (annexin V-FITC), where induced PS by Gal-1 in the neutrophils enhanced the phagocytosis of these cells by macrophages. Therefore, this set of results suggests that Gal-1, exogenous or endogenous, can modulate immune functions of neutrophils and participate in the regulation of inflammatory/infectious disorders.

Keywords: 1. Galectin-1. 2. Neutrophils. 3. Oxidative metabolism. 4. Polymicrobial sepsis.

RESUMEN

Rodrigues, L. C. **Evaluación del impacto biológico de la Galectina-1, endógenos y exógenos, en funciones de los neutrófilos.** 2012. 99 septies. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, de 2012.

La galectina-1 (Gal-1) es una lectina que reconoce β -galactósido y participa en varios procesos biológicos, incluyendo la modulación de la respuesta inflamatoria. Los datos publicados muestran la participación de esta lectina para inducir a la exposición de la fosfatidilserina (FS - un marcador de la apoptosis), en la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la modulación de la quimiotaxis de neutrófilos. Sin embargo, hay pocos datos aún relacionados con el impacto biológico de la Gal-1, exógenos y endógenos, sobre la biología de estas células. Este estudio evaluó, *in vitro*, algunos de los aspectos funcionales de la Gal-1 y neutrófilo interacción. Se determinó el nivel de expresión de Gal-1 (*Western blotting*) y su mRNA (*PCR real time*) en los leucocitos humanos obtenidos de sangre periférica de donantes sanos y la línea celular humana promielocítica (HL-60). Leucocitos de sangre periférica y células HL-60 no expresan niveles detectables de la proteína, así como el Gal-1 RNAm. A través de pruebas de quimioluminiscencia (CL) fue posible analizar la capacidad humana recombinante de Gal-1 para inducir y modular la producción de EROs en neutrófilos humanos no están activadas y activados con *n*-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP). La Gal-1 induce la producción de EROs en forma dosis-dependiente de los neutrófilos activados con fMLP. Sin embargo, en esta lectina no induce el estrés oxidativo en neutrófilos no activados y, además, puede modular negativamente la producción de EROs en respuesta a fMLP. Ambos no activadas y las células activados con fMLP, los efectos de Gal-1 sobre la producción de EROs están parcialmente asociados con su propiedad lectínica. En la literatura no existen datos acerca de la interferencia de Gal-1 en la producción de EROs en neutrófilos activados con dosis repetidas de fMLP. Se sabe que el tratamiento posterior con fMLP produce niveles reducidos de EROs por neutrófilos, sin embargo, la presencia de Gal-1 no afecta a este proceso. Interesantemente, los neutrófilos se recuperó del peritoneo de ratones Gal-1^{-/-} liberados más EROs en respuesta a fMLP y exógenos Gal-1 en comparación con los neutrófilos de animales salvajes. Basándose en los resultados *in vitro* y sabiendo que en la sepsis polimicrobiana, los neutrófilos juegan un papel importante en el paso siguiente consistió en utilizar el modelo M-CLP (sepsis moderada) en ratones que carecen (Gal-1^{-/-}) o no (Gal 1^{+/+}) Gal-1 gen. Animales Gal-1^{-/-} muestran una menor tasa de supervivencia y un menor número de bacterias en la sangre a pesar de tener una mayor carga bacteriana en el foco infeccioso en relación con la fauna silvestre. Los índices de afluencia de neutrófilos en el peritoneo y pulmón son similares en ambos grupos. La participación de Gal-1 en la homeostasis de los neutrófilos se demostró *in vitro* por citometría de flujo (anexina V-FITC), donde FS en la inducción de los neutrófilos tratados con Gal-1 mejorada la fagocitosis de estas células por los macrófagos. Por lo tanto, este conjunto de resultados sugiere que la Gal-1, exógeno o endógeno, son capaces de modular la función inmune de los neutrófilos y participar en la regulación de procesos inflamatorios / infecciosos trastornos.

Palabras clave: 1. La galectina-1. 2. Los neutrófilos. 3. El metabolismo oxidativo. 4. Sepsis polimicrobiana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação das galectinas de mamíferos
Figura 2 -	Galectinas participam de vários eventos biológicos por meio da interação com componentes da superfície de células e matriz extracelular
Figura 3 -	Ativação do complexo NADPH oxidase
Figura 4 -	Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos
Figura 5 -	Obtenção de preparação de Gal-1 purificada
Figura 6 -	Análise do processo de obtenção de Gal-1 purificada por SDS-PAGE
Figura 7 -	Ensaio de hemaglutinação das preparações de Gal-1 alquilada e não alquilada
Figura 8 -	Purificação de neutrófilos humanos pelo gradiente <i>Histopaque</i> ® 1077-1 e 1119-1
Figura 9 -	Leucócitos do sangue periférico e células HL-60 não expressam quantidades detectáveis de Gal-1
Figura 10 -	Efeito dose-dependente do fMLP na produção de EROs em neutrófilos humanos
Figura 11 -	Gal-1 não induz a produção de EROs em neutrófilos não ativados e <i>primed</i>
Figura 12 -	Efeito dose-dependente da Gal-1 na produção de EROs em neutrófilos ativados
Figura 13 -	Galectina-1 induz a produção de EROs em neutrófilos ativados, de modo dependente de capacidade de reconhecer carboidratos
Figura 14 -	Gal-1 induz a produção de EROs em neutrófilos ativados independente da dessensibilização do receptor de fMLP
Figura 15 -	Gal-1 não interfere na produção de EROs em neutrófilos submetidos a ativação sucessiva com fMLP
Figura 16 -	Gal-1 não altera a viabilidade de neutrófilos não ativados ou ativados com fMLP

Figura 17 -	Gal-1 modula a produção de EROs em neutrófilos não ativados ou <i>primed</i>
Figura 18 -	Gal-1 modula a produção de EROs e este efeito é parcialmente revertido pelo TDG
Figura 19 -	Gal-1 exógena não promove alteração na atividade bactericida de neutrófilos, <i>in vitro</i>
Figura 20 -	fMLP e Gal-1 exógena induzem maiores níveis de produção de EROS em neutrófilos de camundongos Gal-1 ^{-/-} em relação aos de camundongos Gal-1 ^{+/+}
Figura 21 -	A ausência de Gal-1 endógena não alterou a taxa de sobrevivência após infecção com 10 ⁷ UFC
Figura 22 -	Animais Gal-1 ^{-/-} apresentam menor quantidade de bactérias no foco infeccioso e no sangue periférico
Figura 23 -	Animais Gal-1 ^{-/-} são mais sensíveis a sepse polimicrobiana moderada.
Figura 24 -	Animais Gal-1 ^{-/-} apresentam maior número de neutrófilos no foco infeccioso após sepse polimicrobiana moderada
Figura 25 -	Animais Gal-1 ^{-/-} submetidos à sepse polimicrobiana moderada apresentam maior quantidade de bactérias no foco infeccioso e menor no sangue periférico
Figura 26 -	Camundongos Gal-1 ^{+/+} e Gal-1 ^{-/-} não apresentam diferenças quanto ao infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar durante a sepse polimicrobiana moderada
Figura 27 -	Macrófagos fagocitam preferencialmente neutrófilos ativados com fMLP e tratados com Gal-1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
¹ O ₂	Oxigênio singlete
2-ME	2-β mercaptoetanol
AA	Ácido Araquidônico
BSA	Albumina Bovina Sérica
C-CLP	Sepse Letal
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
CDR	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i>
Con-A	Concanavalina A
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DAMPs	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DO	Densidade Óptica
DPI	Iodoniodifenileno
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EDTA	<i>EthyleneDiamine Tetraacetic Acid</i>
EROS	Espécies Reativas do Oxigênio
fMLP	<i>n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine</i>
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FS	Fosfatidilserina

Gal-1	Galectina-1
Gal-1 ^{-/-}	Camundongo geneticamente deficiente do gene da galectina-1
Gal-1 ^{+/+}	Camundongos C57BL/6 selvagens
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HL-60	Linhagem Pró-Mielocítica Humana
HRP	Horseradish Peroxidase Conjugate
i.p.	Intraperitoneal
ICAMs	Moléculas de Adesão ao Endotélio
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico Sintetase Induzível
LPS	Lipopolisacarídeo
M-CLP	Sepse Moderada
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reduzida
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NO	Óxido Nítrico
O ₂ ⁻	Superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Solução Salina Fosfato

phox	Phagocyte
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PMN	Polimorfonuclear
QL	Quimioluminescência
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	DodecilSulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em DodecilSulfato de Sódio
TCR	<i>T cell receptor</i>
TDG	<i>Thiogalactoside</i>
TMB	<i>TetraMethilBenzidine</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lectinas: proteínas multifuncionais.....	1
1.2 A galectina-1 (Gal-1).....	6
1.3 O neutrófilo na imunidade inata.....	9
1.4 Participação da Gal-1 nas funções de neutrófilos.....	14
1.5 Participação do neutrófilo na patogénia da sepse.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1).....	19
3.2 Obtenção e cultura de células.....	20
3.3 Separação de neutrófilos humanos.....	20
3.4 Imunodeteção de Gal-1 em leucócitos totais e HL-60 pela técnica de <i>Western-blotting</i>	21
3.5. Análise da expressão de Gal-1 em leucócitos humanos e em células de linhagem HL-60 e HUVEC, por PCR em tempo real.....	22
3.6 Medida do metabolismo gerador de EROs (Espécies Reativas do Oxigênio) por quimioluminescência (QL) em neutrófilos humanos.....	23
3.7 Animais de experimentação.....	24
3.8 Medida do metabolismo oxidativo por QL em neutrófilos de camundongos Gal-1 ^{+/+} e Gal-1 ^{-/-}	25
3.9 Atividade bactericida, <i>in vitro</i> , de neutrófilos humanos.....	25

3.10 Ensaio de atividade bactericida <i>in vivo</i>	26
3.11 Obtenção de macrófagos do lavado peritoneal de camundongos Gal-1+/.	26
3.12 Ensaio de fagocitose de neutrófilos por macrófagos.....	27
3.13 Modelo experimental de sepse polimicrobiana.....	27
3.14 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após a indução da sepse.....	28
3.15 Quantificação de bactérias na sepse.....	29
3.16 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	29
3.17 Análises estatísticas.....	30
3.18. Reagentes e Soluções.....	30
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1).....	34
4.2 Alquilação da Gal-1 com iodoacetamida, e análise da capacidade desta lectina de reconhecer carboidrato.....	37
4.3 Purificação de neutrófilos obtidos a partir de sangue periférico humano.....	39
4.4 Análise da expressão de Gal-1 em leucócitos humanos e em células HL-60 e HUVEC.....	40
4.5 Efeito dose-dependente do fMLP (<i>n-Formyl-Methionyl-Leucyl Phenylalanine</i>) na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos.....	42
4.6 Gal-1 não induz a produção de EROs em neutrófilos não ativados ou pré-tratados com 10^{-9} M de fMLP (<i>primed</i>).....	44
4.7 Gal-1 induz a produção de EROs de modo dose-dependente em neutrófilos ativados por fMLP.....	46
4.8 Gal-1 induz a produção de EROs em neutrófilos ativados de modo dependente de sua atividade lectínica.....	48
4.9 Gal-1 induz a produção de EROs de modo independente do processo de dessensibilização do receptor de fMLP.....	50
4.10 Gal-1 não interfere na dinâmica da produção de EROs em neutrófilos submetidos ao estímulo sucessivo com fMLP.....	52
4.11 Gal-1 não induz morte celular em neutrófilos ativados ou não com fMLP.....	54
4.12 O pré-tratamento de neutrófilos com Gal-1 diminui a produção de EROs em resposta ao fMLP.....	56
4.13 O efeito inibitório da Gal-1 em relação ao fMLP é parcialmente revertido pelo TDG (<i>Thiodigalactoside</i>).....	58

4.14 Gal-1 não interfere na atividade bactericida de neutrófilos, <i>in vitro</i>	60
4.15 Neutrófilos de camundongos Gal-1 ^{-/-} produzem mais EROs em resposta ao fMLP e à Gal-1 exógena em relação aos neutrófilos de camundongos selvagens.....	62
4.16 Animais Gal-1 ^{+/+} e Gal-1 ^{-/-} apresentam a mesma taxa de sobrevivência após infecção com 10 ⁷ UFC (Unidades Formadoras de Colônia).....	64
4.17 Camundongos Gal-1 ^{-/-} apresentam maior atividade bactericida em relação aos animais selvagens.....	66
4.18 Animais destituídos do gene da galectina-1 (Gal-1 ^{-/-}) são mais sensíveis à sepse polimicrobiana moderada.....	68
4.18.1 Animais Gal-1 ^{-/-} apresentam menor taxa de sobrevivência em relação aos animais selvagens.....	68
4.18.2 A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em resposta à sepse polimicrobiana moderada foi maior nos animais Gal-1 ^{-/-}	70
4.18.3 Animais Gal-1 ^{-/-} apresentam menor quantidade de bactérias circulantes, apesar da maior carga bacteriana no sítio de infecção.....	72
4.18.4 Camundongos Gal-1 ^{+/+} e Gal-1 ^{-/-} submetidos à sepse polimicrobiana moderada não apresentam diferenças quanto ao infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar.....	74
4.19 Neutrófilos ativados e tratados com Gal-1 são preferencialmente fagocitados por macrófagos.....	76
5. DISCUSSÃO.....	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. Introdução

1.1 Lectinas: proteínas multifuncionais

As lectinas, também conhecidas como proteínas ligantes de glicanas, são proteínas que se ligam a carboidratos de modo reversível e específico. Glicana é um termo genérico usado para se referir a açúcares ou conjunto de açúcares livres ou ligados a outra categoria de molécula, como proteínas (glicoproteínas) e lipídeos (glicolipídeos). A atividade de reconhecimento de carboidratos das lectinas é frequentemente associada a uma região polipeptídica distinta nessas proteínas, denominada CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) (SHARON, 1993; DODD; DRICKAMER, 2001; VARKI et al., 2009).

As lectinas, animais ou vegetais, são classificadas com base na sequência de aminoácidos e na homologia estrutural de seus CRDs. As lectinas de animais são agrupadas em diferentes famílias identificadas como tipos: C (cálcio dependente), S (galectinas), I, M, L, P, R e outras. Além disso, existe uma classe de lectinas que reconhecem glicosaminoglicanos (GAG). GAGs são polissacarídeos compostos por unidades repetitivas de dissacarídeo linear, como hexosamina e hexose ou ácido hexurônico, associados a cadeias laterais de proteínas (proteoglicanos), ou são complexos de polissacarídeos livres (DRICKAMER, 1988; KILPATRICK, 2002; VARKI et al., 2009).

A primeira lectina de origem animal foi descrita por WATKINS & MORGAN, em 1952, a qual mostrava especificidade para o açúcar L-Fucose. O isolamento da primeira lectina de mamífero, uma lectina hepática ligante de galactose (*the galactose-specific hepatic asialoglycoprotein receptor*), ocorreu em 1974, enquanto os pesquisadores GILBERT ASHWELL e ANATOL G. MORELL buscavam estudar os mecanismos que controlam o tempo de vida de glicoproteínas na circulação sanguínea (HUDGIN et al, 1974; STOCKERT; MORELL; SCHEINBERG, 1974). Ao mesmo tempo, TEICHBERG e colaboradores (1975) realizaram o isolamento a partir de um peixe conhecido como enguia elétrica, do primeiro membro da família das lectinas β -galactose-específicas, a *electrolectin*, hoje denominada galectina-1 (Gal-1) (BARONDES et al., 1994).

A família das galectinas foi inicialmente classificada como tipo-S (dependente de grupos sulfidrílicos) para denotar a presença de cisteínas livres nessas moléculas e a dependência da solubilidade e atividade lectínica na manutenção de seus grupos

sulfidrílicos na forma reduzida (BARONDES et al., 1994; CUMMINGS; LIU, 2009). As galectinas são proteínas solúveis, não possuem peptídeo sinal, estão confinadas em compartimentos citosólicos e são liberadas para o meio extracelular através de um mecanismo secretório não convencional (COOPER; BARONDES, 1990; SATO et al., 1993). Em mamíferos, foram descritas, até o momento, 15 galectinas, subdivididas em três categorias com base na homologia estrutural de seus CRDs e de suas sequências de aminoácidos. A figura 1 ilustra as galectinas do tipo: a) *prototypical*, que são aquelas que contêm um único CRD e formam homodímeros não covalentes; b) *chimeric*, as quais apresentam um CRD e um domínio amino-terminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina, o qual é sensível a metaloproteinases e contribui para a oligomerização dessas lectinas; c) *tandem-repeat*, polipeptídeos únicos compostos por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo ligador de 5 a 50 resíduos de aminoácidos (CUMMINGS; LIU, 2009; BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011).

Figura 1. Classificação das galectinas de mamíferos. As galectinas são classificadas em 3 grupos de acordo com suas características estruturais: *prototypical*, *chimeric* e *tandem repeat*. Os domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) das galectinas apresentam aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos, sendo que apenas alguns desses resíduos interagem diretamente com os carboidratos livres ou constituintes de glicolípidos e glicoproteínas. Os CRDs das galectinas estão representados por formas elípticas em diferentes cores de acordo com cada grupo. A galectina do tipo *chimeric*, galectina-3, pode formar oligômeros, como representado pelas esferas em verde. Adaptado de BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011.

As galectinas são expressas por uma grande variedade de tipos celulares e podem tanto participar de interações célula-célula e célula-matriz extracelular quanto modular funções celulares (CAMBY et al., 2006; CUMMINGS; LIU, 2009). No espaço extracelular, a interação dessas lectinas com glicanas das superfícies de células do sistema imunológico pode, de modo interessante, promover a modulação da produção de citocinas e mediadores, adesão celular, apoptose, quimiotaxia e endocitose (CUMMINGS; LIU, 2009; LIU; RABINOVICH, 2010, BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011).

Figura 2. Galectinas participam de vários eventos biológicos por meio da interação com componentes da superfície de células e matriz extracelular. As galectinas interagem com integrinas e outras moléculas localizadas na matriz e no compartimento celular, regulando eventos de adesão e migração como a formação de pseudópodes, a polimerização de actina e o remodelamento de fibronectina. As interações que envolvem glicolipídeos desencadeiam processos de reorganização de micro-domínios lipídicos e transporte de proteínas através da membrana. Além disso, estas lectinas podem interagir com diferentes receptores celulares, inclusive os do tipo tirosino-quinases e receptores glicoproteicos de células T (TCR, CD3, CD7, CD43, CD45), regulando eventos de sinalização celular mediados por citocinas pró e anti-inflamatórias. O padrão de glicosilação e o estado metabólico das células são fatores determinantes para a ligação galectinas/células e consequentes eventos biológicos resultantes desta interação. Adaptado de BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011.

Já em um ambiente intracelular, as galectinas podem tanto participar de vias de sinalização e *splicing* de mRNA quanto modular algumas respostas biológicas, como apoptose, diferenciação e migração celulares. Assim, essas proteínas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resposta inflamatória, doenças autoimunes, aterosclerose, processos infecciosos e câncer (CUMMINGS; LIU, 2009; LIU; RABINOVICH, 2010).

Recentemente, as galectinas, por reconhecerem glicanas presentes em microrganismos, têm sido consideradas como uma nova classe de receptores para padrões moleculares associadas a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* - PAMPs). Ainda, por serem encontradas em tecidos danificados por ação de patógenos, são descritas como potenciais candidatas a padrões moleculares associados ao dano tecidual (*danger associated molecular patterns* - DAMPs) e, portanto, participam da montagem e desenvolvimento da resposta inata em processos infecciosos (CERRI et al., 2008; SATO et al., 2009). Nesta linha, foi descrito que a galectina-4 e a galectina-8 são capazes de interagir com bactérias que expressam carboidratos do sistema ABO humano e de induzir a morte desses microrganismos (STOWELL et al., 2010).

1.2 A galectina-1 (Gal-1)

A Gal-1, anteriormente chamada de lectina L14 (GU et al., 1994), é uma proteína ácida (pI 5.6), possui N-terminal acetilado, não possui peptídeo sinal e apresenta resíduos de cisteínas livres. Essa lectina apresenta uma topologia molecular do tipo *jelly-roll* composto por duas folhas- β anti-paralelas (LOPEZ-LUCENDO et al., 2004). Os monômeros de Gal-1 possuem massa molecular aparente de ~15kDa, associam-se por meio de interações não covalentes e formam homodímeros com constante de associação de 7 μ M (BARONDES et al., 1994; CHO; CUMMINGS, 1995), sendo que as formas monomérica e dimérica podem ou não apresentar as mesmas propriedades biológicas (CAMBY et al., 2006).

A Gal-1 humana é codificada pelo gene LSGALS1, de 4397 pares localizados no cromossomo 22 região q12 (CHIARIOTTI et al., 2004). O transcrito de 0,6kb resulta do *splicing* de 4 exons e codifica uma proteína de 135 aminoácidos (CHIARIOTTI et al., 2004). A Gal-1 de camundongo é codificada pelo gene *Isgals1*, de 3451 pares de base, localizado no cromossomo 15 na região 44.9cM na citobanda E, dando origem a um transcrito de 817 pares de base, traduzido a uma

proteína de 135 aminoácidos (LOHR et al., 2007). As duas proteínas possuem identidade de 88,15% e homologia de 94% (STOWELL et al., 2009).

Análise de estruturas cristais de Gal-1 ligadas a glicanas (DIAS-BARUFFI et al., 2002; LÓPEZ-LUCENDO et al., 2004), bem como estudos de ligação desta lectina com neoglicoproteínas imobilizadas (STOWELL et al., 2004) e glicoconjugados de superfície celular (PATNAIK et al., 2006), mostram que a Gal-1 reconhece resíduos de galactose terminal e que esta ligação proteína-carboidrato pode ter interferência de glicanas de diferentes complexidades estruturais e ser sensível a condições oxidantes. A expressão de galectina-1 foi observada em células epiteliais do timo (BAUM et al., 1995), em células T primadas com antígeno (BLASER et al., 1998), em macrófagos ativados (RABINOVICH et al., 1996), em células B ativadas (ZUÑIGA et al., 2001), em células endoteliais (LA et al., 2003) e em células do estroma e órgãos linfoides murinos, como o timo e linfonodo (CHIARIOTTI et al., 1999; RABINOVICH; RUBISTEIN; TOSCANO, 2002).

Além de presente no citoplasma, a Gal-1 também foi detectada no núcleo (VYAKARNAM et al., 1998). Diversas evidências indicam que a Gal-1, juntamente com galectina-3, estão envolvidas no *splicing* de pré-mRNA, uma vez que o extrato nuclear depletado de ambas as galectinas perdeu a capacidade de realizar *splicing*, e a adição de Gal-1 ou galectina-3 recombinante foi capaz de restaurar tal atividade (VYAKARNAM et al., 1997).

Foram descritos alguns receptores para Gal-1 em células T, incluindo CD2, CD7, CD43 e CD45 (PACE et al., 1999; 2000; HERNANDEZ et al., 2006), fato evidenciado pela redistribuição dessas glicoproteínas em microdomínios específicos após a incubação com Gal-1. Entretanto, o possível envolvimento de CD45 na indução de apoptose por esta lectina ainda é controverso (WALZEL et al., 1999, NGUYEN et al., 2001; FAJKA-BOJA et al., 2002), provavelmente devido às diferenças na glicosilação específica dessas glicoproteínas, que afetam a resposta de células T à Gal-1. A ligação de Gal-1 a células T inicia uma variedade de eventos de transdução de sinal, tais como ZAP-70 e ERK-2, fosforilação da tirosina de fosfolipase C γ -1 (PC γ -1), influxo de cálcio, ativação de fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B e redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2, importante para a fisiologia e a sobrevivência de célula T (VESPA et al., 1999; RABINOVICH et al., 2000a; TOSCANO et al., 2011).

Além disso, a Gal-1 pode promover a apoptose de células T produtoras da citocina pró-inflamatória IL-17 (T_H17) e não de células T_H2 produtoras de IL-10 e TGF- β (citocinas com caráter anti-inflamatório) (TOSCANO et al., 2007). Interessantemente, as células associadas a linfomas de Hodgkin podem promover o escape da resposta imunológica antitumoral, por expressarem grandes quantidades de Gal-1 (JUSZCZYNSKI et al., 2007). Segundo esses autores, a Gal-1 está envolvida neste processo de escape imunológico por favorecer a secreção de citocinas T_H2 (MOTRAN et al., 2008) e a expansão de células T regulatórias do tipo CD4+, CD25+(*high*) e FOXP3+.

Diversos trabalhos também mostram a participação da Gal-1 na resposta imunológica inata e em processos inflamatórios. A Gal-1 inibe tanto a liberação do ácido araquidônico (AA) e da prostaglandina E2 no modelo de edema de pata causado pela injeção de fosfolipase A₂ (PLA₂) de veneno de abelha (RABINOVICH et al., 2000b), quanto a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de NO sintetase induzível (iNOS) em macrófagos estimulados com LPS (CORREA et al., 2003). Nesta mesma linha, monócitos humanos tratados com essa lectina apresentam redução da fagocitose via receptores da classe Fc γ RI e inibição da expressão de MHCII, com consequente redução da apresentação de antígenos a células T (BARRIONUEVO et al., 2007).

A administração *in vivo* da Gal-1 tem sido usada com sucesso na prevenção da instalação da inflamação crônica em modelos experimentais de encefalomielite autoimune (OFFNER et al., 1990), colite (SANTUCCI et al., 2003), pancreatite crônica (WANG et al., 2000) e artrite reumatoide, em que a administração de Gal-1 aboliu a resposta autoimune. Importante observar que, no último caso, o efeito terapêutico foi acompanhado por mudança de resposta de citocinas para padrão T_H2 (RABINOVICH et al., 1999).

A redução na produção de IFN- γ também foi observada em modelo de hepatite induzida por concanavalina A (Con-A) (SANTUCCI et al., 2000), uveíte autoimune experimental (TOSCANO et al., 2006) e reação de enxerto versus hospedeiro (BAUM et al., 2003). Nesta linha, camundongos deficientes de Gal-1 produzem mais IFN- γ e IL-17 em modelo de neuroinflamação autoimune experimental (TOSCANO et al., 2007).

Portanto, esses estudos realizados em vários modelos experimentais têm estabelecido que a Gal-1 tem atividade anti-inflamatória e imuno-regulatória, estando

essa modulação da resposta imunológica relacionada ao efeito benéfico do uso de Gal-1 no tratamento de diversas doenças autoimunes/inflamatórias experimentais (LIU; RABINOVICH, 2010).

1.3 O neutrófilo na imunidade inata

Os neutrófilos são granulócitos produzidos e armazenados na medula óssea e liberados para o sangue periférico, onde têm uma média de vida na circulação de apenas 6 - 7 horas. Essas células representam de 50 a 70% do total de leucócitos no sangue periférico humano, são esféricas e possuem tamanho de 10 a 20µm de diâmetro, com núcleo segmentado constituído de cromatina purpúrea escura e densa e com de 3 a 5 lóbulos interligados (JOHNSON; VARANI; SMOLEN, 1992). Os grânulos intracelulares são classificados em primários (ou azurófilos), secundários (ou específicos), terciários (ou de gelatinase) e vesículas secretórias, cujos componentes estão relacionados à fagocitose e à morte intracelular de microrganismos (matriz rica em enzimas e peptídeos com atividade microbicidas (BORREGAARD; COWLAND, 1997). Tais grânulos são responsáveis pelo armazenamento e pela expressão de moléculas de adesão (CD18, CD66 e CD67), de receptores (TNFR1-2, CD14, MyD88, fMLPR, CD35, CD16, IgG-A-E, TLR1-2-4-6-8, CXCR-1-2-3-4 INF- α R1-2, IL-1-4-6-10-13-17-18), de proteínas anti-bactérias (GP91^{phox}, p22^{phox}, lisosima, mieloperoxidase, defensinas, entre outras) e de proteases (MMP25, gelatinase, collagenase, elastase, proteinase3 e cathepsinaG) (BORREGAARD; SORENSEN; THEILGAARD-MONCH, 2007; HÄGER; COWLAND; BORREGAARD, 2010).

Os neutrófilos participam do sistema imunológico inato como fagócitos profissionais, contribuindo para a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogênicos (KUMAR; SHARMA, 2010). O recrutamento de neutrófilos ao foco inflamatório/infeccioso envolve uma cascata de eventos iniciada pelo contato dos leucócitos com o endotélio vascular ativado (WILLIAMS et al., 2011). A captura e o rolamento dos neutrófilos são mediados primeiramente pela ligação de moléculas de baixa afinidade, presentes no endotélio (P- e E-selectinas), com ligantes presentes na superfície dos neutrófilos (PSGL-1-ligante de P-selectina, ESL-1-ligante de E-selectina e CD44). A presença de quimiocinas, bem como a ligação com seus respectivos alvos nestas células, modula positivamente a expressão de moléculas de alta afinidade como as integrinas (β 2 – CD18). As integrinas LFA-1

(CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18) interagem com ICAMs (moléculas de adesão expressas no endotélio), diminuindo o rolamento dos neutrófilos para que ocorra transmigração endotelial. Várias proteínas trans-membranares, incluindo PECAM-1, ICAM-1, VE-caderina, JAMs e CD99, também participam deste processo de diapedese (WILLIAMS et al., 2011).

Uma vez no local da inflamação, os neutrófilos atuam através de mecanismos independentes e dependentes de oxigênio, os quais compreendem a fagocitose, a desgranulação, a produção de mediadores anti e pró-inflamatórios (IL-1, IL-6 e IL-8, ativador de plasminogênio, TNF- α), além de poderem atuar como apresentadores de antígenos para linfócitos T (MAYER-SCHOLL et al., 2004). A destruição de patógenos no interior do fagossoma de modo independente do oxigênio ocorre com a fusão de grânulos, seguida da liberação de substâncias microbidas, tais como defensinas, lisozimas e proteases. A elastase neutrofílica é uma enzima efetora chave no sistema imunológico inato, pois apresenta uma potente atividade contra fungos e bactérias, principalmente Gram-negativas (BRINKMANN, 2004; PHAM, 2006).

Além dos mecanismos microbidas independentes de oxigênio, a fagocitose é acompanhada de um conjunto de alterações metabólicas nas células fagocíticas, denominado *burst*, ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa (BABIOR, 1999). A produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) pode ser desencadeada quando as células fagocíticas entram em contato com estímulos como PMA (*Phorbol Myristate Acetate*), fMLP (*n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*), AA, Con-A, ionóforos, complexos imunes e ainda partículas antigênicas (zimozan, látex) opsonizadas com anticorpos e componentes do sistema complemento (BROWN, 1995). O metabolismo oxidativo dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático chamado NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reduzida) oxidase (BABIOR, 2002). O complexo é formado por componentes existentes no citosol [p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}(*phox=phagocyte*) e Rac2] e subunidades encontradas na membrana plasmática, na membrana dos grânulos específicos, de gelatinase e vesículas secretórias (gp91^{phox}, p22^{phox} e Rap1). As duas subunidades gp91^{phox} e p22^{phox} ocorrem como uma flavohemeproteína conhecida como citocromo b558, cuja função é transferir elétrons através da membrana (tanto para fora das células quanto dentro dos fagossomas) para o oxigênio molecular, gerando o ânion superóxido (O₂⁻). A separação desses dois grupos de componentes da NADPH

oxidase e a distribuição entre compartimentos celulares distintos permitem que a oxidase esteja inativa enquanto a célula não for ativada (BABIOR, 2002).

Figura 3. Ativação do complexo NADPH oxidase. Os componentes citosólicos p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} estão complexados, com exceção do Rac2, que, ligado ao GDP, atua como inibidor da translocação. O processo de ativação envolve fosforilação da p47 e consequente translocação do complexo citoplasmático para a membrana, formando o complexo ativo. O NADPH doa seus elétrons, os quais são transferidos para o oxigênio molecular através das subunidades gp91^{phox} e p22^{phox}, gerando o ânion superóxido (O₂⁻). O O₂⁻ é convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que, por sua vez, forma outros radicais livres do oxigênio por meio de reações químicas e enzimáticas. Adaptado de ASSARI, 2006.

A atividade da NADPH oxidase foi verificada em neutrófilos humanos de pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC). A DGC é autossômica recessiva e se caracteriza por um defeito genético no componente citosólico da NADPH oxidase, p⁶⁷ e p⁴⁷ respectivamente, caracterizando as diferentes formas dessa doença (ROOS et al., 1996).

A produção de EROs em neutrófilos ativados pode provocar, na superfície dessas células, a exposição de fosfatidilserina (FS), um componente fosfolipídico normalmente mantido no lado citosólico das membranas celulares e que se torna exposto através de mecanismos de ativação celular e apoptose (ARROYO et al., 2002). Entretanto, FADEEL e colaboradores (1998) demonstraram a existência de dois mecanismos: um dependente da produção de EROs e outro não, responsáveis pela indução de exposição de FS na superfície de neutrófilos e sua consequente eliminação dos tecidos por fagocitose.

Em um estudo que utilizou células diferenciadas HL-60 (linhagem pró-mielocítica humana) e neutrófilos de sadios, essas células confirmaram que o tratamento com ativadores da NADPH oxidase como PMA e zimozan é capaz de disparar a produção de EROs, e o bloqueio da atividade enzimática com DPI (Iodoniodifenileno) mostrou a inibição da explosão respiratória e a falha na exposição da FS na superfície dessas células (ARROYO et al., 2002). O DPI atua no bloqueio da atividade enzimática por captura do elétron no momento da transferência do elétron para o citocromo b, no momento da formação do complexo.

BENGTSOHN e colaboradores (2006) demonstraram ainda que os processos de polimerização e despolimerização do citoesqueleto de actina contribuem para regulação e montagem do complexo NADPH oxidase presente nos neutrófilos.

Na literatura, portanto, ainda são conflitantes os achados referentes à correlação entre apoptose e geração de espécies reativas do oxigênio, bem como os processos que incluem a participação de marcadores constitutivos do reconhecimento celular nos processos de fagocitose e/ou apoptose envolvendo a homeostase de células do sistema imune.

1.4 Participação da Gal-1 nas funções de neutrófilos

Dados da literatura têm mostrado a ação da Gal-1 sobre alguns aspectos funcionais dos neutrófilos. TIMOSHENKO e colaboradores (1993) demonstraram que Gal-1 originada da placenta humana induz a liberação de superóxido em neutrófilos de pacientes com determinados tipos de tumores e que Gal-1 humana, proveniente do baço, também induz o mesmo efeito em neutrófilos homólogos, na presença de citocalasina B (CB) (ELOLA; FLINK, 1999). De modo interessante, há uma correlação positiva entre a inibição da polimerização do citoesqueleto de actina induzida por CB e o aumento da atividade da NADPH oxidase (COHEN; CHOVANIEC; WILSON, 1982). ALMKVIST e colaboradores (2002) mostraram que a Gal-1 se liga, principalmente, à superfície de neutrófilos ativados (membrana dos grânulos de vesículas secretórias e de grânulos de gelatinase). Em neutrófilos ativados e em células de linhagem pró-mielocítica (HL60), foi descrito que esta lectina é capaz de ativar a enzima NADPH oxidase, de induzir expressão de FS e de promover a fagocitose dessas células por macrófagos sem promover fragmentação do DNA, mudanças no potencial da membrana mitocondrial ou ativação de caspases. Desta forma, estes autores sugerem que a Gal-1 participa da homeostase de neutrófilos independentemente da apoptose (ALMKVIST et al., 2002; DIAS-BARUFFI et al., 2003; KARMAKAR; CUMMINGS; MCEVER, 2005; STOWELL et al., 2007).

A explosão respiratória e a exposição de FS em neutrófilos induzida por Gal-1 ocorrem em neutrófilos ativados com fMLP, o que parece estar associado à capacidade de fMLP provocar alterações na superfície dos neutrófilos (DIAS-BARUFFI et al., 2003; ALMKVIST et al., 2002). Além disso, neutrófilos humanos exsudados apresentam maior número de ligantes de Gal-1 em comparação aos neutrófilos do sangue periférico (ALMKVIST et al., 2002). ELOLA e colaboradores (2005) mostraram que o tratamento com Gal-1, proveniente do baço de suínos, permitiu a desgranulação dos neutrófilos na presença de citocalasina B. Ainda, em neutrófilos humanos, de acordo com ALMKVIST e colaboradores (2002), a Gal-1 é capaz de induzir a liberação de MPO (mieloperoxidase) e gelatinase.

Em modelo experimental de inflamação *in vitro* e *in vivo*, a Gal-1 inibiu a migração de neutrófilos induzida por mediadores inflamatórios como a IL-1 β , a IL-8 e o TNF- α (LA et al., 2003). Nesta linha, mostrou-se que essa lectina inibe o edema, o

extravasamento de neutrófilos e a desgranulação de mastócitos (RABINOVICH et al., 2000b).

A interação do neutrófilo com o endotélio promove a expressão de outra lectina: a galectina-3. GIL e colaboradores (2006b) sugeriram um possível papel destas lectinas na modulação da resposta inflamatória. Estes pesquisadores descrevem também que a Gal-1, diferentemente da galectina-3, pode apresentar uma característica anti-inflamatória, pois a primeira é capaz de modular negativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de roedores (GIL et al., 2006a). COOPER e colaboradores (2008) demonstraram *in vitro* que células endoteliais nocauteadas para o gene para Gal-1 promovem um aumento no extravasamento de neutrófilos, sugerindo a participação desta lectina na diminuição da quimiotaxia e no rolamento e na adesão destes leucócitos ao endotélio ativado.

Nesta linha, outros autores demonstraram que o pré-tratamento com Gal-1 no modelo animal de peritonite induzida por zimozan resultou na diminuição da expressão de moléculas de adesão (L-selectina e β 2-integrina) na superfície de neutrófilos. Além disso, houve também uma diminuição nos níveis dos mediadores TNF- α e IL-1 β no lavado peritoneal destes camundongos (GIL; GULLO; OLIANI, 2010).

Na maioria das células não ativadas por estímulos pró-inflamatórios, o NF- κ B está presente no citoplasma e complexado com a proteína inibitória I κ B α (GHOSH; KARIN, 2002). Mediadores pró-inflamatórios, como o LPS e o TNF- α , promovem a fosforilação da proteína inibitória citoplasmática I κ B α , e este processo libera o NF- κ B do complexo inibitório (NF- κ B-I κ B α), permitindo sua translocação para o núcleo e a sua interação com regiões gênicas promotoras responsivas ao NF- κ B (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996). O fator nuclear de transcrição NF- κ B regula a expressão de vários genes pró-inflamatórios como moléculas de adesão (ICAM-1 e V-CAM-1), fatores quimiotáticos (IL-8 dentre outros) e citocinas (IL-6, IL-1 β e TNF- α), podendo participar da patogênese de diversas doenças associadas ao descontrole do processo inflamatório (BARNES; KARIN, 1997; STRNAD; BURKE, 2007). A ativação NF- κ B aumenta a expressão de Gal-1 em células T. Por outro lado, a Gal-1 exógena pode modular negativamente a ativação NF- κ B através da inibição da degradação de seu inibidor I κ B- α (TOSCANO et al., 2011). Estes autores sugerem, portanto, que a Gal-1 participa de um processo auto-regulado através do qual o fator

transcricional NF- κ B aumenta a expressão de Gal-1, o que diminui os eventos de sinalização a ele relacionados.

Embora os mecanismos que controlam a homeostase e as funções de neutrófilos não estejam bem definidos, podemos observar, com base na literatura, que a Gal-1 tem importante participação neste processo.

1.5 Participação do neutrófilo na patogenia da sepse

A sepse é resultado de uma complexa resposta imunológica sistêmica deflagrada por um agente infeccioso. Esta síndrome complexa ocorre quando os mecanismos de defesa inicial do hospedeiro são incapazes de conter a infecção primária, resultando em um processo inflamatório e infeccioso descontrolado, que conduz a quadros de hipotensão, coagulopatia, falha múltipla de órgãos e até a morte (COHEN, 2002).

As características da resposta imunológica inata são cruciais na evolução da sepse. Este processo é mediado por patógenos ou seus produtos, identificados como PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), que são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* – PRR), por padrões moleculares associados ao dano (*danger associated molecular patterns* - DAMP) e por alarminas (CASTELLHEIM et al., 2009). Além disso, evidências recentes têm mostrado que ácidos nucleicos oriundos de patógenos ou de células hospedeiras danificadas participam da modulação da cascata de ativação intracelular (BLEIBLO et al., 2012). A ativação resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas do oxigênio, que, em altas concentrações, conduzem ao choque séptico e à morte (JEAN-BAPTISTE, 2007). Neste contexto, a Gal-1 pode estar envolvida na resolução da sepse por ser descrita, recentemente, como uma molécula associada ao dano celular (DAMP) e, ainda, por atuar como receptora de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (SATO et al., 2009). Esta lectina também participa da modulação negativa de citocinas inflamatórias através da inibição da degradação do inibidor de NF- κ B, o I κ B- α (TOSCANO et al., 2011). Uma vez liberado, o NF- κ B dispara a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β), quimiocinas (IL-8, MIP-1 α , MIP-2), moléculas de adesão (E-selectinas P-selectinas, ICAM-1, V-CAM), iNOS, COX-2, fosfolipase A₂, AA e proteínas de fase aguda (CASTELLHEIM et al., 2009). Dados da literatura mostram ainda que a Gal-1 induz a produção de espécies reativas do

oxigênio em neutrófilos ativados, podendo contribuir para o *clearance* de bactérias. Neste contexto, galectinas 4 e 8 são capazes de reconhecer e eliminar bactérias que expressam carboidratos do sistema ABO humano (STOWELL et al., 2010).

O recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso é primordial para a eliminação de bactérias patogênicas, devido à capacidade destas células de fagocitar e liberar enzimas líticas, radicais livres do oxigênio e do nitrogênio e polipeptídios antimicrobianos (SEGAL, 2005). Animais submetidos à sepse não grave são capazes de controlar a infecção, apresentando uma efetiva migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Em contrapartida, animais submetidos à sepse grave, pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (*CLP - Cecal ligation and puncture*), apresentam comprometimento da migração para o foco primário, resultando no descontrole da infecção (ALVES-FILHO et al., 2006, 2008). A falência na migração dos neutrófilos foi também observada em pacientes sépticos, e, junto a este fenômeno, foi relatada uma menor resposta destas células diante de agentes quimiotáticos como CXCL8, fMLP e LTB4 (TAVARES-MURTA et al., 2002).

O papel do neutrófilo, no entanto, nem sempre é benéfico, podendo ser nocivo no processo de resolução da sepse, pois estas células, quando não migram para o foco primário, acabam sendo sequestradas em órgãos secundários distantes do local da infecção, como pulmão, fígado, rins e coração, conduzindo para lesão tecidual ou perda da função orgânica (COHEN, 2002; ABRAHAM; SINGER, 2007). Estes eventos de migração contribuem para a patogênese da sepse e estão diretamente relacionados com a elevada taxa de mortalidade dos indivíduos acometidos (MULLER KOBOLD et al., 2000; PINHEIRO da SILVA F; SORIANO, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento deste projeto buscou o melhor entendimento da participação da Gal-1 nas funções de neutrófilos relacionadas ao metabolismo oxidativo, na homeostase destas células e na patogenia da sepse, podendo assim gerar subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas no reconhecimento de carboidratos aplicáveis a diversas patologias e associadas ao processo inflamatório.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo estudar o impacto biológico da galectina-1 (Gal-1), exógena e/ou endógena, sobre diferentes aspectos funcionais de neutrófilos humanos e murinos.

2.2 Objetivos Específicos

In vitro:

Avaliação do nível de interferência da Gal-1 em neutrófilos humanos, ativados ou não, sobre alguns aspectos funcionais dessas células como:

- (a) liberação de espécies reativas do oxigênio (EROs);
- (b) atividade bactericida de neutrófilos;
- (c) atividade fagocítica de macrófagos sobre neutrófilos.

In vivo:

Análise da participação da Gal-1 no modelo experimental de sepse induzida (CLP) em camundongos destituídos ou não do gene da Gal-1.

3. Metodologias

3.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1)

As galectinas foram obtidas de culturas de bactérias (*E. coli* cepa M-15) transformadas com plasmídeo PQU-50 contendo o gene completo da Gal-1. A indução da expressão desta proteína pelas bactérias foi feita com adição de 0,36g/L de IPTG (isopropil β -D-tiogalacto-piranozídeo) na cultura. Os sobrenadantes brutos das culturas bacterianas contendo a referida lectina foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose. As preparações de Gal-1 purificadas foram estocadas a -80°C em tampão de eluição [solução salina fosfato (PBS) adicionado de 100mM de lactose e 14mM de 2 β -mercaptoetanol (2-ME)]. Esse processo cromatográfico foi monitorado por leitura de densidade óptica (280nm) e eletroforese em gel de poliacrilamida. As bactérias citadas foram cedidas, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Emory, Atlanta, Georgia – EUA. As concentrações proteicas das soluções de Gal-1 foram determinadas pelas absorbâncias em 280nm, e estes valores foram convertidos para concentração (mg/mL) com o uso do coeficiente de extinção molar (1,17) destas moléculas.

Após esta etapa, as frações de Gal-1 foram tratadas com iodoacetamida (37mg para cada 12mg de proteína - Sigma) por 12 horas, para alquilação de seus sítios oxidáveis, o que aumenta sua estabilidade, embora preserve sua capacidade lectínica. As frações foram então repurificadas em coluna de exclusão molecular (PD10) e submetidas a uma coluna de polimixina B (*Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel* - Pierce), a fim de se removerem resíduos de lipopolissacarídeos (LPS) provenientes da etapa de purificação do lisado bacteriano. Por fim, após a etapa de remoção do LPS, as alíquotas de Gal-1 foram filtradas em membrana de 0,22 μ m para sua esterilização. Em seguida, para testar a atividade lectínica da Gal-1 purificada, foi realizado ensaio de hemaglutinação. Tal experimento foi realizado por meio da reação de inibição da hemaglutinação com açúcar hapteno específico (lactose 20mM) para Gal-1. A sacarose (20mM) foi usada como açúcar hapteno controle. As soluções de Gal-1 e de Gal-1 alquilada foram diluídas (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.250, 0.125 μ M), e 50 μ L de cada uma foram adicionados a 50 μ L de suspensão de hemácias humanas a 3% em solução salina fosfato (PBS) na presença ou

ausência dos açúcares. As hemácias não tratadas foram utilizadas como controle negativo da hemaglutinação. A aglutinação das hemácias foi verificada após 1 hora. Após as etapas de derivatização e confirmação da preservação da propriedade hemaglutinante da Gal-1 alquilada, procedeu-se ao armazenamento dessas preparações a 4°C, até o momento do uso.

3.2 Obtenção e cultura de células

As células da linhagem promielocítica humana (HL60) foram obtidas a partir do banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC - CCL-240™ - EUA) e mantidas em meio RPMI (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (RPMI-C) em câmara úmida a 5%CO₂ a 37°C. As células endoteliais (HUVEC - *Primary Human Umbilical Vein*) foram doadas gentilmente pelo Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, vinculada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP, Brasil, e foram mantidas nas mesmas condições das células da linhagem HL60.

3.3 Separação de neutrófilos humanos

Os neutrófilos foram obtidos a partir do sangue periférico via punção venosa com auxílio de seringa, utilizando tubo que contém o anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®). Após a coleta, 6mL do sangue foram transferidos para um tubo cônico contendo 6mL do gradiente *Histopaque*® 1077-1 e 1119-1 (Sigma). O sangue foi centrifugado por 30 minutos a 700xg em temperatura de 22°C. Duas faixas de mononucleares e de polimorfonucleares foram formadas e, com auxílio de uma pipeta, coletadas. As hemácias foram lisadas com 0,83% NH₄Cl pH7,4 e as células posteriormente lavadas com PBS. As células foram contadas em câmara de *Neubauer* e o valor ajustado em 1x10⁶ células/mL em meio Hanks para serem utilizados nos respectivos ensaios. A taxa de viabilidade foi analisada com o uso do corante de exclusão Azul de Tripán 0.4% (m/v).

Os leucócitos humanos foram obtidos a partir de doadores voluntários, de acordo com o termo de consentimento aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP/FCFRP n°255).

3.4 Imunodeteção de Gal-1 em leucócitos totais e células HL-60 pela técnica de *Western-blotting*

Leucócitos totais e células HL60 foram colocados em tampão de amostra. O material, então, foi centrifugado por 10 minutos a 10000g, e os sobrenadantes de cada preparação foram submetidos à determinação da concentração proteica total com o uso do kit *BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc. USA)*. Como controles, foram utilizadas diferentes concentrações de Gal-1 (480, 240, 120, 60, 30, 15 e 7.5ng de proteína). Finalmente, as amostras de cada sobrenadante foram submetidas à SDS-PAGE, em concentração equivalente a 50µg de proteína e em condições redutoras. A corrida eletroforética foi realizada em mini-gel de poliacrilamida com concentração de 12,5%, utilizando tampão convencional de corrida, contendo tris-glicina e 0,1% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio - Sigma). As proteínas foram, então, eletrotransferidas do gel para a membrana de nitrocelulose (0,22µm; Hybondn - *Amersham Biosciences*, Alemanha) por 1,5 horas a 25V (300-400mA) em tampão tris-glicina contendo 10% metanol. A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração das membranas com o corante ponceau S. A etapa de bloqueio foi realizada pela incubação das membranas com solução de PBS contendo 5% de leite bovino desnatado, por 2 horas. Sequencialmente, a membrana foi incubada com 0,25µg/mL de anticorpo monoclonal de anti-Gal-1 humana, purificado por afinidade, diluído em PBS contendo 1% de soro albumina bovino (BSA - Sigma), por 1,5 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi submetida a três lavagens com PBS/tween 20 0,05% por 10 minutos cada, sobre agitação. Após as etapas de lavagens, incubou-se a membrana com 40ng/mL de IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (HRP: *Horseradish Peroxidase Conjugated - Jackson ImmunoResearch* - EUA) por 1 hora. Três etapas de lavagens foram repetidas. A imunorreatividade para Gal-1 foi detectada usando *kit ECL Western Blot (Amersham)* e filme fotográfico (*Hyperfilm™ ECL™ – Amersham*).

3.5. Análise da expressão de Gal-1 em leucócitos humanos e em células de linhagem HL-60 e HUVEC, por PCR em tempo real

O RNA total de cada amostra foi purificado a partir de 1×10^6 células, utilizando o *RNeasy Protect Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha). A reação de PCR em tempo real foi realizada com o kit *SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA) em termociclador *Mastercycler EP realplex* (Eppendorf, Alemanha).

Foi realizada a quantificação relativa do gene Gal-1 utilizando o gene β -actina como normalizador. As reações de PCR em tempo real foram feitas em triplicata, utilizando primers específicos em conjunto com o reagente *SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA). A amplificação foi realizada em um volume final de 25 μ L, utilizando 10 μ L do reagente *Master Mix* (ou *SYBrGreen Master Mix*), 1 μ L de cada primer específico (10 μ M), 4 μ L de H₂O e 5 μ L de RNA diluído (equivalente a aproximadamente 10ng de RNA total). Primers:

Gal-1:

forward primer: 5'CCTGGAGAGTGCCTTCGAGT3';

reverse primer: 5'CACACGATGGTGTGGCGTC3'.

β -actina:

forward primer: 5'ATTGCCGACAGGATGCAGAA3';

reverse primer: 5'ACAGCGAGGCCAAGGATGGA3'.

O aparelho de detecção de PCR em tempo real *Mastercycler EP realplex* (Eppendorf, Alemanha) foi utilizado juntamente com o *software Realplex V2.2* para obtenção dos valores de CT. As condições padrão de amplificação foram 50°C - 2 minutos, 95°C - 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C - 15 segundos e 60°C - 1 minuto (anelamento e extensão simultânea).

3.6 Medida do metabolismo gerador de EROs (Espécies Reativas do Oxigênio) por quimioluminescência (QL) em neutrófilos humanos

O metabolismo gerador de EROs ou *burst oxidativo* foi avaliado com base na metodologia descrita por CHEUNG et al., 1983. Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram tratados em meio Hanks, na presença ou ausência de fMLP (*n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine* - Sigma) nas concentrações de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} M durante 10 minutos, a 37°C. Em seguida, tanto as células não tratadas quanto as tratadas com fMLP foram incubadas ou não, com diferentes concentrações de Gal-1 (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M e 1,25 μ M). Em uma terceira etapa de ativação, as células foram estimuladas com fMLP 10^{-6} M por mais 10 minutos. A produção de EROs foi quantificada durante todo o período de ativação das células a cada 10 minutos, totalizando 30 minutos. A sequência de adição dos estímulos está descrita nas respectivas legendas dos gráficos, e o método de quantificação de EROs a partir das áreas relativas de quimioluminescência está detalhado na figura 4. Como controle da produção espontânea de EROs (controle negativo), foram utilizados neutrófilos não estimulados. Para testar se os efeitos da Gal-1 em relação à liberação de EROs são dependentes da atividade lectínica, foram utilizados lactose (20mM) e TDG (5mM - *Thiodigalactoside*) como açúcar hapteno específico e sacarose (20mM) como açúcar hapteno controle, ambos na presença de Gal-1.

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado pela produção de QL dependente de luminol (10^{-4} mol/L - 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona - Sigma), acompanhado em luminômetro *Auto Lumat LB 953 da EG&G Berthold (Bad Wildbad, Alemanha)*. O registro foi feito em c.p.m. (contagem de fótons por minuto), e os resultados foram expressos em cpm/tempo.

Figura 4: Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos. A produção de EROs foi avaliada em neutrófilos humanos (5×10^5) por quimioluminescência amplificada por luminol. Após a incubação das células com luminol (10^{-4} M, 2 minutos a 37°C), a reação foi iniciada com adição do 1º estímulo, seguido de um 2º estímulo e, por último, a adição de um 3º estímulo. Em cada etapa, a quimioluminescência foi monitorada por 10 minutos a 37°C . Os estímulos fMLP e Gal-1 foram adicionados de acordo com as sequências descritas nas legendas das figuras. A produção de EROs foi quantificada pela emissão de luz capturada (cpm: contagem de fótons por minuto) pelo equipamento *Luminometer (Auto Lumat LB modelo 953, EG & G Berthold, Bad Wildbad, Baden-Württemberg, Germany)*. A área integrada de QL foi calculada a partir dos seguintes intervalos de tempo: 0-3 minutos (Área 1), 10-13 minutos (Área 2) e 20-23 minutos (Área 3), contemplando aproximadamente 80% da área referente ao pico de produção de EROs. B_{QL1} : linha de base referente às Áreas 1 e 3; B_{QL2} : linha de base referente à Área 2. A, B e C: adição dos estímulos nos respectivos tempos de 0, 10 e 20 minutos.

3.7 Animais de experimentação

Para realização de experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, selvagens (Gal-1^{+/+}) ou destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}), machos e adultos, pesando de 25 a 30g. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA - USP, Câmpus de Ribeirão Preto – Protocolo nº 09.1.323.53.5). Os camundongos Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Os animais destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}) foram cedidos, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings. A genotipagem dos animais foi feita por PCR utilizando dois diferentes conjuntos de *primers* para o gene da galectina-1 de camundongo, que gera *amplicons* de 326 pares de base (pb) (*forward* - 326: 5' CAG GTC TCC AAG CTG ATG TC 3'- *reverse* - 326: 5' CTC TTG GCG GAG TCC CCG AC 3') e *amplicons* 1263 pb (*forward* - 1263: 5' TGG TGG AGG TCT AGC CAG GA 3'- *reverse* 1263: 5' TGA GAC CAG ATT CCC GTT TGA 3'). Além disso, um conjunto de *primers* para detectar K7 *neo-amplicons* de 480 pb, foi utilizado (*forward*

- 480: 5' CCT TGC AAA GTC CAG TAT TCT GC 3' - reverse - 480: 5' ACC TGC GTG CAA TCC ATC TTG 3').

3.8 Medida do metabolismo oxidativo por QL em neutrófilos de camundongos *Gal-1*^{+/+} e *Gal-1*^{-/-}

Neutrófilos de camundongos *Gal-1*^{+/+} e *Gal-1*^{-/-} foram coletados da cavidade peritoneal após 6 horas da injeção de tioglicolato a 3%. As células da cavidade peritoneal foram obtidas pela injeção de 3mL de PBS no peritônio destes animais. A porcentagem de neutrófilos foi verificada por meio da contagem diferencial das células depositadas em lâminas e coradas com Panótico Rápido (Laborclin). Após coleta, as células foram estimuladas com 3×10^{-6} M de fMLP ou com Gal-1 10 μ M por 10 minutos a 37°C. Como controle da produção espontânea de EROs (controle negativo), foram utilizados neutrófilos não estimulados. O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado pela produção de QL dependente de luminol (10^{-4} mol/L - 5-amino-2-3-dihidro-1,4-ftalazinediona - Sigma), acompanhado em luminômetro *Auto Lumat LB 953 da EG&G Berthold (Bad Wildbad, Alemanha)*. O registro foi feito em c.p.m. (contagem de fótons por minuto), e os resultados foram expressos em cpm/tempo. As análises das áreas integradas de QL foram realizadas de acordo com a metodologia descrita na figura 4.

3.9 Atividade bactericida, *in vitro*, de neutrófilos humanos

Para o ensaio de atividade bactericida de neutrófilos humanos, foi utilizada a cepa bacteriana *E. coli* O86:B7 – GFP (*green fluorescence protein*) cultivada em meio LB (*Luria-Bertani* – Himedia), adicionando-se 100 μ g/mL dos antibióticos

ampicilina (Sigma) e cloranfenicol (Sigma). A quantidade de bactérias foi determinada em espectrofotômetro a 600nm, confirmada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placas contendo 1.5% (m/v) de ágar em meio LB. As bactérias foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings. Os neutrófilos foram isolados do sangue periférico de doadores sadios através de centrifugação em gradiente de densidade *Histopaque*® 1077-1 e 1119-1, como descrito no item 3.3. Após o isolamento, 1×10^5 neutrófilos foram tratados ou não com Gal-1 ($10 \mu\text{M}$ - 10min a 37°C) e, em seguida, incubados por 2 horas (37°C em estufa de 5% CO_2) com aproximadamente 10^8 UFC/mL de cultura de E.coli O86:B7 – GFP (*green fluorescence protein*). A intensidade de fluorescência, relativa à carga bacteriana, foi determinada no equipamento *IVIS®Spectrum* no tempo 0 e após 2 horas da adição da cultura de E. coli. A intensidade média de fluorescência (MIF) foi utilizada para se determinar a atividade microbica de neutrófilos tratados com Gal-1 em relação aos neutrófilos não tratados com esta lectina.

3.10 Ensaios de atividade bactericida *in vivo*

Primeiramente foi avaliada a taxa de mortalidade durante 7 dias após a injeção intraperitoneal (i.p.) de 4×10^8 UFC/mL de cultura de bactérias em camundongos selvagens (Gal-1^{+/+}) e Gal-1^{-/-}. As bactérias foram isoladas a partir das fezes coletadas da região do ceco de animais selvagens e cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI - ®BD). A atividade bactericida foi avaliada após 6 horas de injeção i.p. de 4×10^8 UFC/mL. $10 \mu\text{L}$ do lavado peritoneal diluído (1:100 e 1:1000 em PBS estéril), e $10 \mu\text{L}$ de sangue puro foram semeados em placas de Petri contendo meio ágar *Mueller Hinton* (*Difco Laboratories*). Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 18 horas a 37°C , e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

3.11 Obtenção de macrófagos do lavado peritoneal de camundongos Gal-1^{+/+}

Três dias antes da coleta de macrófagos do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6, foram injetados, na cavidade peritoneal, com auxílio de agulha e seringa, 2mL de tioglicolato a 3%. As células da cavidade peritoneal foram obtidas pela injeção de 3mL de PBS no peritônio destes animais. As células foram ressuspensas em meio RPMI-C e contadas em câmara de Neubauer. 5×10^5 células

em 500µL/poço foram distribuídas em placa de 24 poços contendo lamínula de vidro e incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Ao findar do período de incubação, as células não aderentes foram removidas, lavando-se três vezes os poços com meio RPMI-C. A porcentagem de macrófagos foi verificada por meio da contagem diferencial das células depositadas em lâminas e coradas com Panótico Rápido (Laborclin).

3.12 Ensaio de fagocitose de neutrófilos por macrófagos

O ensaio de fagocitose foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por GARYU et al., 2004. Os neutrófilos humanos ($1,5 \times 10^6$ células/poço em placa de 24 poços), obtidos a partir do sangue periférico (item 3.3), foram pré-tratados ou não com 10^{-7} M de fMLP (10 minutos, 37°C, 5%CO₂). Em seguida, as células foram estimuladas com 10µM de Gal-1 por 4 horas a 37°C, 5%CO₂. Para testar se os efeitos da Gal-1 são dependentes da atividade lectínica, foram utilizadas lactose (20mM) como açúcar hapteno específico e sacarose (20mM) como açúcar hapteno controle, ambas na presença de Gal-1.

Após 4 horas, os neutrófilos foram adicionados à placa de cultura de 24 poços contendo macrófagos peritoneais (na proporção de 3:1) obtidos de camundongos selvagens (item 3.11). Os neutrófilos foram mantidos em cultura por 4 horas e, em seguida, foram lavados com PBS, para a retirada de células não fagocitadas. As células aderidas à lamínula foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin). A fagocitose de neutrófilos foi avaliada pela contagem de 200 macrófagos por lâmina. Os resultados foram expressos como Índice Fagocítico, e a porcentagem de macrófagos que tinham fagocitado os neutrófilos foi multiplicada pelo número médio de neutrófilos contido no interior dos macrófagos (FADOK et al., 1992; ZHUANG et al., 1998).

3.13 Modelo experimental de sepse polimicrobiana

Foi utilizado, como modelo de sepse polimicrobiana, o modelo de ligação e perfuração do ceco (*CLP - Cecal ligation and puncture*) originalmente descrito por Baker e colaboradores (1983), com algumas modificações. Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de tribromoetanol 2,5% (10µL/g), realizando-se, em seguida, uma incisão de 1 cm no abdômen. O ceco, então, foi exposto e ligado logo abaixo da válvula ileocecal, sem

obstrução total. Após a ligadura, o ceco foi perfurado de acordo com o grau de infecção desejado:

- 1- Controle (ou falso operado) - os animais falso-operados (controles) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem as perfurações.
- 2- Sepse Moderada (*M-CLP*) - foram realizadas três perfurações transversais com agulha 30G.
- 3- Sepse grave (*Letal-CLP* ou *L-CLP*) - foram realizadas duas perfurações transversais com agulha 18G.

Em seguida, o ceco foi pressionado levemente para certificar a saída das fezes pelas perfurações e colocado de volta no abdômen, sendo a incisão suturada. Uma injeção subcutânea de 1mL de solução salina foi administrada nos camundongos para hidratar os animais até a volta da anestesia. A mortalidade dos animais foi avaliada durante o período de 7 dias após a indução da sepse. Para avaliação da migração celular e outros parâmetros, os animais foram sacrificados após 6 horas da *CLP*.

3.14 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após a indução da sepse

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi determinada 6 horas após a indução da sepse. Os animais foram sacrificados, e a cavidade peritoneal foi lavada com 3mL de tampão PBS contendo EDTA 1mM. A partir do lavado peritoneal, foram feitas as contagens totais e diferenciais das células.

A contagem total foi realizada com auxílio de contador automático de células (*Coulter Ac.T*) e expressa como número de células $\times 10^6$ /mL.

A contagem diferencial foi realizada a partir de esfregaços preparados com o auxílio de uma cito centrífuga (Cytospin 3; *Shandon*®). 40 μ L do lavado peritoneal foram fixados em lâminas e corados pelo método de Panótico Rápido (Laborclin). As células foram examinadas em microscópio óptico (aumento de 1000x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se dois tipos celulares: neutrófilos e mononucleares. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela porcentagem dessas células contadas nos esfregaços em relação às células totais. Os resultados foram expressos como número de cada tipo celular $\times 10^6$ /cavidade.

3.15 Quantificação de bactérias na sepse

A quantificação de bactérias no lavado peritoneal e no sangue foi realizada 6 horas após a indução da sepse nos animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}. A quantificação de bactérias foi realizada como descrito no item 3.9.

3.16 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nos pulmões dos animais submetidos à sepse foi determinada pelo ensaio da atividade da mieloperoxidase no homogeneizado do pulmão obtido 6 horas após indução de sepse (ALVES-FILHO et al., 2006). Para tal, após perfusão com salina, o pulmão de cada animal foi coletado, colocado em 200µL de tampão gelado pH 4,7 (NaCl 0,1M, NaPO₄ 0,02M, EDTA 0,012M) e, posteriormente, homogeneizado com o auxílio de um triturador (*Pollytron*). O material homogeneizado foi, em seguida, centrifugado a 3000rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado, então, um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 600µL de 0,2% NaCl, seguido por 600µL de uma solução de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de nova centrifugação a 3000rpm por 15 minutos a 4°C, o *pellet* foi ressuspensão em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, esse homogeneizado foi congelado e descongelado três vezes em nitrogênio líquido e novamente centrifugado a 400xg por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 3µL do sobrenadante das amostras foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, foram adicionados 25µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6mM final na placa), e a placa foi incubada por 5 minutos a 37°C. Logo após, 100µL de H₂O₂ 0,5mM foram adicionados nos poços, e a placa foi incubada por mais 5 minutos a 37°C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal 6 horas após camundongos serem injetados com carragenina e diluídos em NaPO₄ 0,08M (1x10⁵ neutrófilos/poço/50µL)). Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA (*Spectra Max 250; Molecular Devices*) no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por mg de tecido.

3.17 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prisma 5 (*Graphpad*). Nos casos de diferentes tratamentos, o teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as alterações entre eles. Em todos os casos, comparações individuais foram testadas com teste t de *Tukey* (comparações múltiplas) ou teste t de *Student* (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas figuras. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM, e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$. As curvas de sobrevida foram expressas como porcentagem de camundongos vivos observados em um intervalo de 24 horas durante os 7 dias avaliados. Para a análise estatística das curvas de sobrevida, foi utilizado o teste Mantel-Cox logrank (X^2 “chi-squared”) e consideraram-se valores significantes para $p < 0.05$.

3.18. Reagentes e Soluções

Tampão fosfato em salina pH 7.2 (PBS) 10 X

Cloreto de Sódio (NaCl).....	80g
Cloreto de Potássio (KCl)	2g
Fosfato de Sódio Dibásico (Na ₂ HPO ₄)	11,5g
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	20g
Água Mili-Q q.s.p	1000mL

Tampão fosfato em salina pH 7.2 (PBS) 1 X

PBS 10 X	100mL
Água deionizada q.s.p	1000mL

PBS – EDTA

PBS 1 X	100mL
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).....	37,2mg

Solução de tribromoetanol 2,5%

2,2,2 - tribromoetanol	250mg
Salina (NaCl 0,9%) q.s.p.	10mL

Meio ágar Mueller-Hinton

Ágar Mueller-Hinton.....	38g
Água deionizada q.s.p.	1L

Solução de Triton X-100 0,2%

Triton X-100.....	200µL
Água Mili-Q q.s.p.	100mL

Tampão de lise

Cloreto de amônia (NH ₄ Cl)	8,04g
EDTA.....	0,36g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	0,64g
Água Mili-Q q.s.p.	1L

Meio RPMI pH 7.4

Meio RPMI-1640 (<i>Sigma-Aldrich</i>)	10,4g
Hepes.....	2,38g
NaHCO ₃ (Vetec)	2,2g
Água Mili-Q q.s.p.	1L

Meio RPMI + 0,1% de BSA

RPMI.....	100mL
BSA (Soro Albumina Bovina, <i>Sigma-Aldrich</i>).....	0,01g

Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico n° 1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0,1%.

Panótico n° 2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1%.

Panótico n° 3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%.

Soluções utilizadas para o ensaio de MPO**1-Tampão NaPO₄ 0,08M**

Solução A: NaH ₂ PO ₄	12,48g/L
---	----------

Solução B: Na_2HPO_411,35g/L

Solução A: 196 mL + Solução B 4,0 mL . O pH foi ajustado para 5,4

2-Tampão NaPO_4 0,05M

Tampão NaPO_4 0,08M.....125mL

Água Milli-Q75mL

3-Solução de H-TAB 0,5 % (Brometo de amônio hexadeciltrimetil)

Brometo de hexadeciltrimetil amônio, H-TAB.....1g

Fosfato de sódio, NaPO_4 0,05M.....200mL

Ajustar pH 5,4

4-Solução de TMB (3,3',3,3' - tetrametil-benzidina)

Tetrametilbenzidina, TMB (*Sigma-Aldrich*)3,845mg

Dimetil sulfoxido, DMSO (dimetil sulfoxido)1000 μ L

5-Solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 3 %10,0 μ L

Fosfato de sódio, NaPO_4 0,08M.....12,5mL

Tampão Hanks pH 7.4

Cloreto de Sódio (NaCl)8g

Cloreto de Potássio (KCl)0,4g

Fosfato de Sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....0,12g

Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4).....0,06g

Bicarbonato de sódio(NaHCO_3).....0,35g

Cloreto de Cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....0,18g

Cloreto de Magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....0,10g

Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....0,10g

Glicose.....1,0g

Água deionizada q.s.p.....1L

Tampão de corrida pH 8,30.

SDS.....1,0g

Glicina.....14,4g

Tris (*Invitrogen*).....3,0g

Água deionizada q.s.p.....1L

Ajustar pH 8,3, esterilizar e estocar a 4°C.

Tampão de transferência pH 8,30.

SDS.....1,3g

Glicina.....18,8g

Tris (*Invitrogen*).....3,94g

EtOH 100%240mL

Água deionizada q.s.p.....1L

Tampão de amostra para SDS-PAGE pH 7.0

SDS.....2% (p/v)

Glicerol.....5% (p/v)

Tris (*Invitrogen*).....62,4mM

Serva-Blue0,1mM

β-Mercaptoetanol.....0,9%

EDTA.....0,25mM

Água deionizada q.s.p.....1L

4. Resultados

4.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1)

As preparações de galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1) purificadas foram obtidas por cromatografia de afinidade em colunas de agarose-lactose de lisados de bactérias transformadas com o gene completo da Gal-1 e tratadas com o indutor de expressão gênica (IPTG). A produção média da Gal-1 purificada foi de 30mg/L de cultura de bactérias. O perfil da cromatografia de afinidade, monitorado pela densidade óptica em 280nm, é mostrado na Figura 5A. Considerando que a Gal-1 perde sua capacidade de reconhecimento de carboidratos na ausência de seus ligantes e/ou agentes redutores (VARKI et al., 1999), as preparações de Gal-1 purificadas foram estocadas a -80°C em tampão de eluição (PBS acrescido de 100mM de lactose e 14mM de 2-ME). Imediatamente antes do uso, as preparações de Gal-1 foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (PD10) para remoção da lactose e do 2-ME. Este procedimento foi acompanhado por leitura da absorbância em 280nm (Figura 5B). A análise eletroforética da fração mais concentrada do pico de eluição da cromatografia em coluna de agarose-lactose demonstrou a presença de duas bandas proteicas, uma majoritária, com massa molecular aparente de 15kDa, e outra minoritária, de aproximadamente 31kDa (Figura 6, pista 3). Experimentos de *Western-blotting*, usando anticorpo monoclonal anti-Gal-1, mostraram que essas duas bandas proteicas correspondem à forma monomérica (15kDa) e dimérica (31kDa) dessa lectina, o que foi confirmado por espectrometria de massas (dados não mostrados). Desta forma, a estratégia de purificação da Gal-1 foi eficiente, pois apenas com uma etapa de purificação foi possível obter preparações de Gal-1 com alto grau de homogeneidade e atividade lectínica preservada. Como ilustrado na Figura 6, a Gal-1 foi removida do sobrenadante bruto bacteriano (pista 2) e recuperada na fração retida na coluna de agarose-lactose (pista 3). Os resultados obtidos nesta fase estão de acordo com dados já descritos na literatura (DIAS-BARUFFI et al., 2003) e forneceram subsídios necessários para a continuidade experimental do trabalho.

A)

B)

Figura 5. Obtenção de preparação de Gal-1 purificada. Bactérias transformadas com o plasmídeo PQU-50 contendo o gene completo da Gal-1 humana foram tratadas com IPTG, e os extratos bacterianos submetidos à cromatografia em coluna agarose-lactose. O material retido foi eluído com PBS acrescido de lactose (100mM) e 2-ME (14mM). As amostras eluídas contendo Gal-1 foram aplicadas em coluna de exclusão molecular (PD-10) para a remoção da lactose e do 2-ME. Os cromatogramas de afinidade e de exclusão molecular estão indicados nos painéis (A) e (B), respectivamente. As frações cromatográficas foram monitoradas por absorbância em 280nm. Foram obtidos aproximadamente 30mg de galectina-1 recombinante humana por litro de cultura bacteriana. As concentrações proteicas das frações foram calculadas com o uso do coeficiente de extinção molar da Gal-1 humana (1,17) e estão representadas nos cromatogramas e expressas em mg/mL .

Figura 6. Análise do processo de obtenção de Gal-1 purificada por SDS-PAGE.

Amostras de diferentes etapas do procedimento de obtenção e de purificação de Gal-1 em colunas de agarose-lactose foram aplicadas em gel de poliacrilamida (15%) em condições redutoras e dissociantes. As amostras foram: **1**-Lisado de bactérias submetido à indução com IPTG (0,36g/L); **2**-Fração do lisado bacteriano não retida na coluna; **3**-Fração retida e eluída da coluna com lactose (100mM). Na pista **3**, nota-se uma banda com massa molecular de aproximadamente 14,9kDa (forma monomérica da Gal-1) e outra minoritária com aproximadamente 31kDa (forma dimérica da Gal-1). A massa molecular (MM) aparente da Gal-1 foi estimada com o auxílio de diferentes marcadores com MM de 97 a 14,4kDa. O gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue*.

4.2 Alquilação da Gal-1 com iodoacetamida e análise da capacidade desta lectina de reconhecer carboidrato

A Gal-1 possui 6 cisteínas, 3 das quais apresentam o átomo de enxofre na forma reduzida. O tempo de estocagem da proteína pode promover a oxidação desses aminoácidos e, conseqüentemente, uma drástica redução de sua propriedade lectínica (VARKI et al., 1999). Com o objetivo de otimizar a produção e o uso desta lectina recombinante, procedeu-se à alquilação com a iodoacetamida (WHITNEY et al., 1986), um composto redutor alquilante que reage de modo covalente com os grupos sulfidrílicos, gerando a CarboxiAmidoMetil-Gal-1. Após a estabilização desta lectina com iodoacetamida, a manutenção da capacidade da Gal-1 de reconhecer glicanas foi testada através de ensaio de hemaglutinação. A Gal-1 alquilada e a Gal-1 recém-purificada apresentaram o mesmo padrão de hemaglutinação (reação positiva até 2.0 μ M), e, na presença de lactose (20mM), o efeito hemaglutinante da Gal-1 derivatizada ou não foi completamente inibido em todas as concentrações testadas desta lectina (Figura 7). Estes resultados mostraram que o processo de alquilação da Gal-1 com iodoacetamida não afetou a propriedade lectínica desta proteína. Como previsto, a atividade hemaglutinante da Gal-1 alquilada foi preservada completamente após estocagem a 4°C por 15 dias. Entretanto, estes achados não foram observados quando se testou a Gal-1 não derivatizada e armazenada nas mesmas condições da Gal-1 alquilada (dados não mostrados). Portanto, conseguiu-se, com este procedimento, uma preparação de Gal-1 mais estável, favorecendo o uso mais racional dos recursos do laboratório.

Figura 7. Ensaio de hemaglutinação das preparações de Gal-1 alquilada e não alquilada. Hemácias humanas a 3% em PBS foram tratadas com Gal-1 ou Gal-1 tratada com iodoacetamida (CarboxiAmidoMetil, Gal-1-alquilada). Foram utilizados 50μL de diferentes concentrações dessas proteínas (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.250, 0.125μM), aos quais foram adicionados 50μL de hemácias em placas de hemaglutinação. A aglutinação das hemácias foi avaliada após 2h. A atividade lectínica dessas preparações proteicas foi analisada através da reação de inibição da hemaglutinação com o carboidrato hapteno específico para Gal-1, a lactose (20mM). A sacarose (20mM) foi usada como hapteno controle. As hemácias não desafiadas com Gal-1 ou Gal-1 alquilada foram consideradas o controle negativo de hemaglutinação (0). O número destacado em vermelho representa a menor concentração hemaglutinante dessas lectinas (2μM).

4.3 Purificação de neutrófilos obtidos a partir de sangue periférico humano

A figura 8 ilustra a eficiência de resolução do gradiente de separação *Histopaque*® 1077-1 e 1119-1 no processo de purificação de polimorfonucleares e mononucleares a partir do sangue periférico humano. Os leucócitos obtidos apresentaram alta porcentagem de viabilidade celular determinado pelo corante Azul de Tripan ($\geq 98\%$). As suspensões de neutrófilos apresentaram elevados índices de pureza (95%), verificados por meio da contagem diferencial das células depositadas em lâminas e coradas com Panótico Rápido (Laborclin). Além disso, conseguiram-se, em média, $2,5 \times 10^6$ neutrófilos viáveis/mL de sangue.

Figura 8. Purificação de neutrófilos humanos pelo gradiente *Histopaque*® 1077-1 e 1119-1. Amostras de sangue periférico humano (6mL) de doadores sadios foram coletadas através de punção venosa em tubo contendo EDTA (*Vacutanier* BD®). Adicionaram-se 6mL do sangue colhido a 6mL do gradiente de separação. Após etapa de centrifugação (30 minutos/700g/22°C), a suspensão celular foi quantificada com o uso de câmara de Neubauer e teve sua taxa de viabilidade analisada com o uso do corante de exclusão (0.4% de Azul de Trypan).

4.4. Análise da expressão de Gal-1 em leucócitos humanos e em células HL-60 e HUVEC

Avaliou-se o nível de expressão proteico da Gal-1 e de seu mRNA, a partir da quantificação do cDNA, em leucócitos humanos obtidos do sangue periférico de seis doadores saudáveis, em células da linhagem promielocítica humana (HL-60) e de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC-*Primary Human Umbilical Vein*). Os resultados de *Western-blotting* mostraram que, nas células HUVEC, foi possível detectar Gal-1 (Figura 9A). Entretanto, em leucócitos humanos e nas células HL-60, não foi detectada a presença desta lectina (Figura 9A e B). A sensibilidade da imunodeteção, por *Western-blotting*, foi indicada por meio de uma curva padrão de Gal-1 (480 a 7.5ng). Esta curva padrão indicou que a quantidade mínima de lectina detectada foi de 30ng (Figura 9B). O próximo passo foi avaliar o nível de expressão de mRNA para Gal-1, por PCR em tempo real. Foram detectados baixos níveis de expressão do mRNA para Gal-1 em leucócitos humanos periféricos não ativados e nas células HL-60, ao contrário das células HUVEC (Figura 9C). Estes resultados foram recentemente publicados por DIAS-BARUFFI et al., 2010.

Figura 9. Leucócitos do sangue periférico e células HL-60 não expressam quantidades detectáveis de Gal-1. A análise da expressão proteica por *Western-blotting* foi realizada em amostras de leucócitos totais do sangue periférico humano, de células da linhagem promielocítica humana (HL60) e de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC). **(A):** Expressão de Gal-1 em células HUVEC. **(B):** Curva padrão de detecção de Gal-1 (7.5 a 480ng de proteína) e expressão desta lectina em leucócitos obtidos de 6 doadores saudáveis. **(C):** Expressão do mRNA para Gal-1 em leucócitos humanos, células de linhagem HL-60 e HUVEC, por PCR em tempo real. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.5 Efeito dose-dependente do fMLP (*n*-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine) na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) em neutrófilos humanos

Para determinar a capacidade do fMLP em induzir a produção de EROs em neutrófilos, as células foram tratadas com diferentes concentrações deste peptídeo formilado (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} M) por 10min. O perfil de liberação de EROs mostrou que, nas concentrações de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M de fMLP, os neutrófilos liberaram EROs de modo dose-dependente. Entretanto, neutrófilos tratados com 10^{-9} M apresentaram níveis de produção de EROs semelhantes aos do controle negativo (células não tratadas) (Figura 10A). O gráfico de barras (Figura 10B) representa as áreas integradas de quimioluminescência (QL) referentes ao período de 0-3min após tratamento das células (Área 1, item 3.5 da metodologia). Com a obtenção destes resultados, foi possível monitorar o estado de ativação dos neutrófilos nos experimentos consecutivos utilizando o fMLP como controle positivo da ativação celular.

A)

B)

Figura 10. Efeito dose-dependente do fMLP na produção de EROs em neutrófilos humanos. O metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos (5×10^5) tratados com fMLP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-9}M$ -10min a $37^\circ C$) foi analisado através do ensaio de QL amplificada por luminol. (A): Representação do perfil de liberação de EROs (cpm: contagem por minuto) após 10min. (B): Representação das áreas integradas de QL relativas ao tempo de ativação de 0-3min (Área 1). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs (Hanks). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: $*p < 0.05$ versus controle (Hanks) (ANOVA e pós-teste Dunnett).

4.6 Gal-1 não induz a produção de EROs em neutrófilos não ativados ou pré-tratados com 10^{-9} M de fMLP (*primed*)

Avaliou-se o efeito da Gal-1 na produção de EROs por neutrófilos não ativados ou *primed* (10^{-9} M fMLP). Segundo alguns autores, a liberação de EROs e a desgranulação não são ativadas nas células *primed*, mas estas células estão preparadas para potencializar a resposta celular a estímulos como fMLP, interleucina-8 (IL-8) ou citocalasina B (HALLETT; LLOYDS, 1995). Neste contexto, os neutrófilos foram pré-tratados ou não com 10^{-9} M de fMLP por 10min. Em seguida, as células foram tratadas com 10 μ M de Gal-1 ou 10^{-9} M de fMLP e monitoradas quanto à liberação de EROs por mais 10min. A Gal-1 não induziu a produção de radicais livres do oxigênio em neutrófilos não ativados nem pré-tratados com 10^{-9} M de fMLP (Figura 11). Estes achados estão de acordo com dados da literatura segundo os quais a Gal-1 induz o metabolismo oxidativo apenas em neutrófilos ativados (ALMKVIST et al., 2002; ELOLA; CHIESA; FINK, 2005).

Figura 11. Gal-1 não induz a produção de EROs em neutrófilos não ativados e *primed*.

Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram pré-tratados ou não com fMLP (10^{-9} M - 10 min a 37°C) e posteriormente tratados ou não com Gal-1 ($10 \mu\text{M}$ - 10 min a 37°C) ou fMLP (10^{-9} M). O metabolismo oxidativo foi analisado através do ensaio de QL amplificada por luminol. O gráfico representa as áreas integradas de QL (cpm: contagem por minuto) referentes ao tempo de tratamento de 10-13 min (Área 2). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs (Hanks). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: $p > 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.7 Gal-1 induz a produção de EROs de modo dose-dependente em neutrófilos ativados por fMLP

O próximo passo foi, portanto, avaliar a relação de dose-dependência da Gal-1 na indução do metabolismo oxidativo em neutrófilos ativados. As células foram, então, pré-ativadas com fMLP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M - 10min) e, em seguida, submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de Gal-1 (20, 10, 5 e $1.25\mu\text{M}$). O perfil de QL foi monitorado durante 10min após a adição de Gal-1 (Figura 12A). A Gal-1 foi capaz de induzir a produção de EROs de modo dose-dependente em neutrófilos pré-ativados com fMLP (Figuras 12A e B). Entretanto, este efeito da Gal-1 foi independente das concentrações de fMLP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) utilizadas na fase inicial de ativação das células (Figura 12B). Estes dados sugerem que, a partir do estado de ativação dos neutrófilos, esta lectina atua promovendo a produção de EROs de modo dependente de sua concentração.

A)

B)

Figura 12. Efeito dose-dependente da Gal-1 na produção de EROs em neutrófilos ativados. Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram pré-tratados com fMLP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M - 10min a 37°C) e, em seguida, tratados com Gal-1 (20, 10, 5 e $1.25 \mu\text{M}$ - 10min a 37°C). O metabolismo oxidativo foi analisado através do ensaio de QL amplificada por luminol. (A): Representação do perfil de liberação de EROs (cpm: contagem por minuto). (B): Representação das áreas integradas de QL relativas ao tempo de tratamento de 10 a 13min (Área 2). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs (barra branca). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: $p < 0.05$ versus controle (Hanks) (ANOVA e pós-teste Dunnett).

4.8 Gal-1 induz a produção de EROs em neutrófilos ativados de modo dependente de sua atividade lectínica

Para investigar se a capacidade da Gal-1 de produzir EROs está relacionada à sua atividade lectínica, foram realizados ensaios de inibição, utilizando lactose (20mM) como açúcar hapteno específico e sacarose (20mM) como controle. Primeiramente, as células foram ativadas com fMLP (10^{-7} M - 10min) e, em seguida, tratadas com Gal-1 (10 μ M - 10min) na ausência e na presença de lactose e de sacarose. O tratamento com lactose foi capaz de inibir drasticamente a atividade da Gal-1 de produzir EROs. Por outro lado, neutrófilos pré-ativados com fMLP e tratados somente com Gal-1 ou com Gal-1 adicionado de sacarose apresentaram resultados similares quanto à geração de EROs (Figura 13). Esses resultados demonstram que a propriedade lectínica da Gal-1 está associada à indução do metabolismo oxidativo nos neutrófilos ativados e estão de acordo com dados da literatura (ALMKVIST et al., 2002).

Figura 13. Galectina-1 induz a produção de EROs em neutrófilos ativados, de modo dependente da capacidade de reconhecer carboidratos. Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram pré-tratados com fMLP (10^{-7} M, 10min, 37°C) e tratados com Gal-1 (10μ M - 10min a 37 °C), na presença e/ou ausência de lactose (20mM) e de sacarose (20mM). O metabolismo oxidativo foi avaliado por QL amplificada por luminol. O gráfico corresponde à área integrada de QL (cpm: contagens por minuto) referente ao tempo de tratamento de 10-13min (Área 2). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs (barra branca do gráfico). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: * $p < 0.05$ versus controle (Hanks) (ANOVA e pós-teste Dunnett).

4.9 Gal-1 induz a produção de EROs de modo independente do processo de dessensibilização do receptor de fMLP

A próxima etapa foi comparar a indução do metabolismo oxidativo nos neutrófilos tratados por duas vezes com fMLP em relação às células pré-tratadas com fMLP e estimuladas com Gal-1. Os neutrófilos foram, então, pré-ativados com diferentes concentrações de fMLP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) por 10min e posteriormente reestimulados ou não com 10^{-6} M de fMLP ou 10 μ M de Gal-1, por mais 10min. Como esperado, a Gal-1 induziu níveis semelhantes de EROs nos neutrófilos pré-ativados com diferentes concentrações de fMLP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) (Figura 14). Por outro lado, quanto maior a concentração de fMLP utilizada na fase de pré-ativação, menor a resposta celular de produção de EROs, obtida na segunda fase de ativação com 10^{-6} M de fMLP (Figura 14). Estes achados mostram que o processo de autorregulação do fMLP pode estar associado ao fenômeno da reciclagem de seus receptores (PANARO; MITOLO, 1999) e sugerem, ainda, que a Gal-1 induz a produção de EROs independentemente do processo de dessensibilização do receptor de fMLP em neutrófilos ativados.

Figura 14. Gal-1 induz a produção de EROs em neutrófilos ativados independentemente da dessensibilização do receptor de fMLP. Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram pré-tratados com diferentes concentrações de fMLP (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M - 10min a 37°C) e, em seguida, tratados com Gal-1 ($10\mu\text{M}$ - 10min a 37°C) ou com fMLP (10^{-6} M - 10min a 37°C). O metabolismo oxidativo foi analisado através do ensaio de QL amplificada por luminol. As barras representam as áreas integradas de QL (cpm: contagem por minuto) referentes ao tempo de tratamento de 10-13min (Área 2). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs ($3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$ cpm). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: a e b apresentam diferenças estatísticas, $p < 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.10 Gal-1 não interfere na dinâmica da produção de EROs em neutrófilos submetidos ao estímulo sucessivo com fMLP

Avaliou-se a interferência da Gal-1 na resposta sucessiva ao estímulo fMLP, utilizando-se 3 fases de ativação seguidas de detecção de EROs. Inicialmente, os neutrófilos foram ativados com diferentes concentrações de fMLP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M – 10min) e, em seguida, tratados com diferentes concentrações de Gal-1 (20, 10, 5, 1.25 μ M – 10min). Em uma terceira etapa de ativação, as células foram submetidas ao tratamento com 10^{-6} M de fMLP por mais 10min. As análises das áreas integradas de QL da terceira etapa de ativação foram feitas com base nos 3 primeiros minutos após adição de 10^{-6} M de fMLP (20 a 23min - Figura 15). Estas análises mostraram que as concentrações de fMLP utilizadas na primeira etapa de ativação são determinantes para a produção de EROs pelos neutrófilos na terceira etapa de re-estimulação com 10^{-6} M de fMLP (Figura 15). Ainda, estes efeitos ocorreram de modo independente das concentrações de Gal-1 utilizadas entre as duas etapas de estimulação com fMLP. Portanto, quanto maior o nível de ativação com fMLP no tempo 0, menor a resposta ao estímulo consecutivo com fMLP, na presença ou ausência de Gal-1, o que sugere que esta lectina não interfere na dinâmica da reciclagem do receptor de fMLP em neutrófilos ativados.

Figura 15. Gal-1 não interfere na produção de EROs em neutrófilos submetidos à ativação sucessiva com fMLP. Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram pré-tratados com diferentes concentrações de fMLP (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M - 10 min a 37°C) e, em seguida, tratados com Gal-1 nas concentrações de 20, 10, 5 e $1.25 \mu\text{M}$ (10 min a 37°C). Após este período, as células foram ativadas novamente com fMLP (10^{-6} M - 10 min a 37°C). O metabolismo oxidativo foi analisado através do ensaio de QL amplificada por luminol. As barras representam as áreas integradas de QL (cpm: contagem por minuto) referentes à ativação com 10^{-6} M de fMLP - Área 3 (20-23 min). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs ($3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$ cpm). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: a, b e c representam diferenças significativas, $p < 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.11 Gal-1 não induz morte celular em neutrófilos ativados ou não com fMLP

Neutrófilos tratados com fMLP na presença ou ausência de Gal-1 foram analisados quanto à viabilidade celular. Constatou-se que neutrófilos submetidos aos tratamentos com fMLP 10^{-7} M, Gal-1(10 μ M), fMLP 10^{-7} M+Gal-1(10 μ M) e fMLP 10^{-7} M+Gal-1(10 μ M)+fMLP 10^{-6} M não tiveram a viabilidade celular comprometida após 30min, pois apresentaram níveis de marcação com iodeto de propídeo semelhantes aos do controle negativo (Figura16). Deste modo, tanto o tratamento dos neutrófilos com Gal-1 quanto as doses consecutivas de fMLP não induziram necrose nestas células.

Figura 16. Gal-1 não altera a viabilidade de neutrófilos não ativados ou ativados com fMLP. Neutrófilos tratados por 30min com fMLP 10^{-7} M, Gal-1(10 μ M), fMLP 10^{-7} M+Gal-1(10 μ M) ou fMLP 10^{-7} M+Gal-1(10 μ M)+fMLP 10^{-6} M foram submetidos ao ensaio de viabilidade celular por meio da marcação com iodeto de propídeo (PI) em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem de neutrófilos não marcados com PI (células PI negativas). As células não tratadas foram utilizadas como controle. Análise estatística: $p > 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.12 O pré-tratamento de neutrófilos com Gal-1 diminui a produção de EROs em resposta ao fMLP

Avaliou-se o efeito do pré-tratamento dos neutrófilos (não ativados ou *primed*) com Gal-1 na produção de EROs induzida por fMLP. Os neutrófilos foram pré-tratados com Gal-1 (1.25 μ M e 10 μ M) e, em seguida, ativados com 10⁻⁶M de fMLP. Alternativamente, as células foram pré-tratadas com 10⁻⁹M de fMLP (*primed*) antes da adição de Gal-1 e ativadas com 10⁻⁶M de fMLP. A análise das áreas integradas de QL após ativação com 10⁻⁶M de fMLP mostrou que o pré-tratamento com Gal-1, na concentração de 10 μ M, diminuiu significativamente a liberação de EROs (55%) pelos neutrófilos não ativados ou *primed* (Figura 17). Entretanto, 1.25 μ M de Gal-1 não interferiu na produção de EROs nestas células (Figura 17). Portanto, 10 μ M de Gal-1 foi capaz de modular negativamente e de modo semelhante à produção de EROs induzida por fMLP em neutrófilos não ativados ou *primed*.

Figura 17. Gal-1 modula a produção de EROs em neutrófilos não ativados ou *primed*. Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram pré-tratados ou não com fMLP 10^{-9} M (*primed*, 10min a 37°C) e, em seguida, tratados com Gal-1 (1.25 μ M ou 10 μ M - 10min a 37°C). Após este período, as células foram ativadas com fMLP 10^{-6} M (10min a 37°C). O metabolismo oxidativo foi analisado através do ensaio de QL amplificada por luminol. O gráfico de barras representa a área integrada de QL (cpm: contagem por minuto) após ativação com fMLP (10^{-6} M) – Área 3 (20-23min). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs (barra branca do gráfico). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: *a* e *b* representam diferenças significativas, $p < 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.13 O efeito inibitório da Gal-1 em relação ao fMLP é parcialmente revertido pelo TDG (*Thiodigalactoside*)

Para analisar se o efeito inibitório da Gal-1 em relação às células não ativadas é dependente de sua atividade lectínica, foi utilizado TDG (*Thiodigalactoside* - 5mM) como açúcar inibidor hapteno específico para Gal-1 e sacarose (5mM) como controle. Os neutrófilos não ativados foram pré-tratados com Gal-1 (10 μ M – 10min) na presença ou ausência dos açúcares e, em seguida, as células foram estimuladas com 10⁻⁶M de fMLP, por mais 10min. A análise das áreas integradas de QL após o tratamento das células com 10⁻⁶M de fMLP mostrou que o efeito modulatório da Gal-1 foi parcialmente inibido na presença de TDG (49%). Ao contrário, a sacarose não interferiu no efeito inibitório da Gal-1 sobre a liberação de EROs em neutrófilos após ativação com 10⁻⁶M de fMLP (Figura 18). A presença dos açúcares TDG e sacarose na concentração de 5mM não alterou o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Portanto, estes dados mostram que a propriedade lectínica pode estar envolvida no efeito inibitório da Gal-1 na produção de EROs em células não ativadas.

Figura 18. Gal-1 modula a produção de EROs, efeito que é parcialmente revertido pelo TDG. Os neutrófilos humanos (5×10^5) foram tratados com Gal-1 ($10 \mu\text{M}$ - 10min a 37°C) na presença ou ausência de TDG (5mM) ou de sacarose (açúcar não específico - 5mM). Em seguida, as células foram ativadas com fMLP (10^{-6}M , 10min, 37°C) e o metabolismo oxidativo avaliado por QL amplificada por luminol. O gráfico corresponde às áreas integradas de QL (cpm: contagens por minuto) referentes ao tempo de 10-13min de ativação (Área 2). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs ($3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$ cpm). Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: *a* e *b* apresentam diferenças estatísticas; #: 49% inibição TDG+Gal-1+fMLP versus Gal-1+fMLP (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.14 Gal-1 não interfere na atividade bactericida de neutrófilos, *in vitro*.

O próximo passo foi avaliar o efeito da Gal-1 em relação à atividade bactericida de neutrófilos obtidos de sangue periférico humano. Para tanto, estas células foram tratadas ou não com 10 μ M de Gal-1 por 10min e, em seguida, incubadas por 2h com aproximadamente 10⁸UFC/mL de cultura de *E.coli* O86:B7 – *GFP* (*green fluorescence protein*). Após 2h, o tratamento dos neutrófilos com Gal-1 não alterou a intensidade média de fluorescência (MIF) relativa à carga bacteriana (Figura 19). Esses achados sugerem que Gal-1 exógena não interfere na atividade bactericida de neutrófilos nas condições experimentais utilizadas.

Figura 19. Gal-1 exógena não promove alteração na atividade bactericida de neutrófilos, *in vitro*. Neutrófilos humanos (1×10^5) foram tratados ou não com Gal-1 ($10 \mu\text{M}$ - 10min a 37°C) e, em seguida, incubados por 2h (37°C em estufa de 5% CO_2) com aproximadamente 10^8 UFC/mL de cultura de *E.coli* O86:B7 – GFP (*green fluorescence protein*). A intensidade de fluorescência, relativa à carga bacteriana, foi determinada no equipamento *IVIS®Spectrum*. O gráfico de barras representa a média de intensidade de fluorescência ($\text{MIF} \times 10^{-6}$) no tempo inicial de adição da cultura de bactérias e após 2h. Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: $p > 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.15 Neutrófilos de camundongos Gal-1^{-/-} produzem mais EROs em resposta ao fMLP e à Gal-1 exógena em relação aos neutrófilos de camundongos selvagens

Para avaliar a interferência da Gal-1 endógena na produção de EROs, utilizaram-se neutrófilos de camundongos destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1^{-/-}) e de camundongos selvagens (Gal-1^{+/+}). Os neutrófilos foram coletados da cavidade peritoneal após 6h da injeção de tioglicolato a 3%. Em seguida, as células foram tratadas ou não com fMLP ou com Gal-1 por 10min. A análise das áreas integradas de QL mostrou que neutrófilos inflamatórios de camundongos Gal-1^{-/-} liberaram mais EROs após ativação com 3×10^{-6} M de fMLP (Figura 20A). Ainda, a ausência da Gal-1 endógena favoreceu a produção de EROs por estas células após o tratamento com a Gal-1 exógena na concentração de 10 μ M (Figura 20B). Este resultado sugere que a Gal-1 endógena pode estar envolvida na regulação do metabolismo oxidativo de neutrófilos.

A)

B)

Figura 20. fMLP e Gal-1 exógena induzem maiores níveis de produção de EROS em neutrófilos de camundongos Gal-1^{-/-} em relação aos de camundongos Gal-1^{+/+}. Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Gal-1^{+/+} e de Gal-1^{-/-} após 6h da injeção de 2mL de tioglicolato a 3%. Em seguida, as células (5x10⁵) foram tratadas ou não com fMLP (3x10⁻⁶M) (A) ou com Gal-1 (10μM) (B) por 10min a 37°C e o metabolismo oxidativo avaliado por QL amplificada por luminol. Os gráficos correspondem às áreas integradas de QL (cpm: contagens por minuto) referentes ao tempo de 0-3min de ativação (Área 1). As células não tratadas foram utilizadas como controle da liberação espontânea de EROs. Os resultados são representativos de 6 experimentos. Análise estatística: a, b, e c apresentam diferenças significativas, p<0.05 (ANOVA e pós-teste Tukey).

4.16 Animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} apresentam a mesma taxa de sobrevivência após infecção com 10⁷ UFC (Unidades Formadoras de Colônia)

Camundongos Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foram submetidos à injeção i.p. de 10⁷ UFC e avaliados quanto à taxa de sobrevivência no período de 7 dias após a infecção. A taxa de sobrevivência para ambos os grupos foi de 80% após o período analisado (Figura 21).

Figura 21: A ausência de Gal-1 endógena não altera a taxa de sobrevivência após infecção com 10^7 UFC. A porcentagem de sobrevivência foi determinada diariamente por um período de 7 dias após a injeção i.p. de 10^7 UFC em camundongos selvagens e Gal-1^{-/-}. A taxa de sobrevivência dos animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foi de 80%. (* $p > 0.05$ – teste: Mantel-Cox logrank). Os resultados são representativos de 3 experimentos com 6 animais por grupo.

4.17 Camundongos Gal-1^{-/-} apresentam maior atividade bactericida em relação aos animais selvagens

A atividade bactericida foi avaliada no sangue e no lavado peritoneal de camundongos Gal-1^{-/-} e Gal-1^{+/+} após 6h da injeção de 10⁷ UFC. As bactérias foram obtidas a partir das fezes liofilizadas do ceco de animais selvagens. Nos animais Gal-1^{+/+}, a carga bacteriana foi maior tanto no lavado peritoneal (Figura 22A) quanto no sangue (Figura 22B) em relação à dos animais selvagens. Este resultado sugere que a ausência da Gal-1 endógena pode ter sido responsável pelo aumento da atividade bactericida de camundongos Gal-1^{-/-}.

A)

B)

Figura 22: Animais Gal-1^{-/-} apresentam menor quantidade de bactérias no foco infeccioso e no sangue periférico. O número de bactérias foi avaliado no lavado peritoneal (A) e no sangue circulante (B) após 6h da injeção i.p. de 10⁷ UFC nos animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}. O número de bactérias (UFC: unidades formadoras de colônia/mL de amostra) foi calculado a partir do cultivo das amostras em placas contendo ágar Mueller-Hinton por 18h. Análise estatística: a e b apresentam diferenças estatísticas, *p<0.05 (ANOVA e pós-teste Tukey). Os resultados são representativos de 3 experimentos realizados com 6 animais por grupo.

4.18 Animais destituídos do gene da galectina-1 (Gal-1^{-/-}) são mais sensíveis à sepse polimicrobiana moderada

4.18.1. Animais Gal-1^{-/-} apresentam menor taxa de sobrevivência em relação aos animais selvagens

Foi avaliada a resposta à sepse polimicrobiana moderada (M-CLP - *Cecal ligation and puncture*) e letal (L-CLP), em camundongos selvagens (Gal-1^{+/+}) e destituídos do gene da galectina-1 (Gal-1^{-/-}). Após 1 semana de observação, os resultados mostraram que camundongos Gal-1^{-/-} apresentaram maior susceptibilidade à infecção polimicrobiana moderada em relação aos camundongos Gal-1^{+/+} (Figura 23). A taxa de sobrevivência dos animais Gal-1^{+/+} foi de 83%, enquanto que apenas 50% dos Gal-1^{-/-} sobreviveram. No modelo de sepse letal, não foram observadas diferenças entre as taxas de sobrevivência, pois os animais de ambos os grupos foram a óbito após 36h (dados não mostrados).

Figura 23: Animais Gal-1^{-/-} são mais sensíveis à sepse polimicrobiana moderada. A sobrevivência dos animais selvagens (Gal-1^{+/+}) e Gal-1^{-/-} submetidos à sepse polimicrobiana (M-CLP) foi determinada diariamente por um período de 7 dias. Os animais foram submetidos à sepse moderada através de uma perfuração com agulha 30G, ou foram falso-operados. A taxa de sobrevivência dos animais Gal-1^{-/-} submetidos à sepse moderada foi menor (30%) em relação aos Gal-1^{+/+} (*p<0.05 – teste: Mantel-Cox logrank). Os resultados são representativos de 3 experimentos com 5 animais por grupo.

4.18.2 A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em resposta à sepse polimicrobiana moderada foi maior nos animais Gal-1^{-/-}

Para investigar o possível mecanismo que proporcionou a melhoria da sobrevivência nos animais Gal-1^{-/-}, foi avaliado o recrutamento de neutrófilos no sítio de infecção após 6h, no modelo de sepse moderada. As cavidades peritoneais de camundongos Gal-1^{-/-} submetidos a M-CLP apresentaram maior número de neutrófilos quando comparadas às dos animais selvagens (*p>0.05) (Figura 24). Considerando que a Gal-1 inibe a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (LA et al., 2003), os resultados estão de acordo com a literatura, pois os animais Gal-1^{-/-} apresentaram maior número de neutrófilos na cavidade peritoneal no modelo de M-CLP.

Figura 24: Animais Gal-1^{-/-} apresentam maior número de neutrófilos no foco infeccioso após sepse polimicrobiana moderada. Animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foram submetidos à sepse polimicrobiana moderada (M-CLP). Após 6h, a cavidade peritoneal foi lavada, e o número de neutrófilos foi quantificado. Análise estatística: *a* e *b* apresentam diferenças estatísticas; *b**: animais Gal-1^{-/-} apresentaram maior número de neutrófilos na cavidade peritoneal em relação aos animais selvagens no modelo de M-CLP ($p < 0.05$ ANOVA e pós-teste Tukey). Animais não submetidos à perfuração, mas operados, foram utilizados como controle. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados com 5 animais por grupo.

4.18.3. Animais Gal-1^{-/-} apresentam menor quantidade de bactérias circulantes, apesar da maior carga bacteriana no sítio de infecção

O número de bactérias foi avaliado no lavado peritoneal e na corrente sanguínea após 6h da indução da sepse moderada nos animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}. A figura 25A mostra que a taxa de recuperação de bactérias no lavado peritoneal de animais Gal-1^{-/-} foi superior à taxa encontrada nos animais selvagens. Curiosamente, foi possível detectar maior quantidade de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC) no sangue de animais selvagens (Figura 25B). Estes dados sugerem que, embora no período de 6h, a carga bacteriana tenha sido maior no sítio primário, a infecção sistêmica foi menor, dado que está de acordo com a maior sobrevivência dos animais Gal-1^{-/-} (Figura 23).

A)

B)

Figura 25: Animais Gal-1^{-/-} submetidos à sepse polimicrobiana moderada apresentam maior quantidade de bactérias no foco infeccioso e menor no sangue periférico. O número de bactérias foi avaliado no lavado peritoneal (A) e no sangue circulante (B) após 6h da indução da sepse moderada nos animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}. O número de bactérias (UFC: unidades formadoras de colônia/mL de amostra) foi calculado a partir do cultivo das amostras em placas contendo ágar Mueller-Hinton por 18h. Animais não submetidos à perfuração intestinal, mas operados, foram utilizados como controle. Análise estatística: a e b apresentam diferenças estatísticas e *p<0.05 quando comparados os grupos Gal-1^{+/+} versus Gal-1^{-/-} submetidos a M-CLP (ANOVA e pós-teste Tukey). Os resultados são representativos de 3 experimentos realizados com 5 animais por grupo.

4.18.4. Camundongos Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} submetidos à sepse polimicrobiana moderada não apresentam diferenças quanto ao infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar

Para avaliar o infiltrado de neutrófilos nos pulmões dos animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}, após 6h da indução da sepse moderada, determinou-se a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) neste tecido. A figura 25 mostra que, embora os animais Gal-1^{-/-} apresentassem menor quantidade de bactéria no sangue periférico (Figura 25B), os pulmões destes animais continham números similares de neutrófilos em relação aos animais selvagens infectados (Figura 26). Este resultado mostra que a ausência de Gal-1 endógena não promoveu uma maior migração de neutrófilos para o tecido pulmonar de animais Gal-1^{-/-} no modelo de M-CLP.

Figura 26. Camundongos Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} não apresentam diferenças quanto ao infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar durante a sepse polimicrobiana moderada. O infiltrado de neutrófilos foi determinado pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no pulmão, após 6h da indução da sepse moderada nos animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}. Animais não submetidos à perfuração, mas operados, foram utilizados como controle. Análise estatística: *a* e *b* apresentam diferenças significativas, $p < 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey). Os resultados são representativos de 3 experimentos realizados com 5 animais por grupo.

4.19 Neutrófilos ativados e tratados com Gal-1 são preferencialmente fagocitados por macrófagos

Macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos selvagens foram analisados quanto à capacidade de fagocitar neutrófilos não ativados ou ativados e tratados ou não com Gal-1. Primeiramente, os neutrófilos foram ativados ou não com 10^{-7} M de fMLP durante 10min e, em seguida, tratados ou não, por 4h, com 10 μ M de Gal-1. Após este período, os neutrófilos foram colocados em contato com os macrófagos por 1h. Os dados obtidos mostraram que o tratamento de neutrófilos com Gal-1, após ativação com 10^{-7} M de fMLP, foi capaz de modular positivamente a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos (Figura 27). Além disso, o índice fagocítico foi menor (10%) nas células tratadas com Gal-1 e lactose (20mM), o que não ocorreu com as células que foram tratadas com Gal-1 e sacarose (20mM) (20%) (Figura 27). Esses dados sugerem que o tratamento de neutrófilos com Gal-1 foi responsável pela modulação da fagocitose de modo dependente de sua atividade lectínica e que esta proteína pode estar envolvida na homeostase de neutrófilos.

Figura 27. Macrófagos fagocitam preferencialmente neutrófilos ativados com fMLP e tratados com Gal-1. Neutrófilos (2×10^5) foram ativados ou não com fMLP(10^{-7} M – 10min) e, em seguida, tratados ou não com $10 \mu\text{M}$ de Gal-1 (4h, á 37°C , $5\%\text{CO}_2$) na presença ou ausência de lactose (Lac-20mM) ou de sacarose (Sac-20mM). Macrófagos (5×10^5) recuperados do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 foram colocados em contato com os neutrófilos por 1h a 37°C . Após este período, as células foram submetidas à Cytospin e coradas com corante panótico. A fagocitose de neutrófilos por macrófagos foi avaliada pela contagem de 200 neutrófilos por lâmina. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao índice fagocítico, que corresponde à porcentagem de macrófagos que fagocitaram multiplicado pelo número médio de neutrófilos contido no interior dos macrófagos. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Análise estatística: a e b apresentam diferenças significativas, $p < 0.05$ (ANOVA e pós-teste Tukey).

5.0 Discussão

No presente trabalho, investigou-se a capacidade de leucócitos circulantes e células HL60 (uma linhagem modelo de neutrófilos humanos) expressarem Gal-1 e a participação desta lectina na modulação de funções de neutrófilos. Assim, demonstrou-se que leucócitos obtidos do sangue periférico e células HL-60 não expressam níveis proteicos detectáveis de Gal-1. Estes achados estão de acordo com dados da literatura que mostram que neutrófilos do sangue periférico não expressam essa molécula (LA et al., 2003). Ainda, como ilustrado na figura 9, não foi possível detectar mRNA para Gal-1 nas células estudadas neste trabalho. Entretanto, neutrófilos que migram para o sítio inflamatório após lesão medular passam a expressar grandes quantidades de Gal-1 (KURIHARA et al., 2010). A Gal-1 participa de vários eventos da resposta inflamatória aguda, regulando funções de neutrófilos como a inibição da migração e a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células através da sinalização celular associada ao fator de transcrição NFκB (LA et al, 2003, COOPER et al., 2008, TOSCANO et al., 2011). Por outro lado, a Gal-1 aumenta a atividade da NADPH oxidase em polimorfonucleares, indicando que os efeitos antagônicos desta lectina podem estar relacionados à sua capacidade de modulação da resposta imunológica e a propriedade das galectinas de apresentarem ações biológicas diferentes em função da localização tecidual dessas moléculas (RUBINSTEIN et al., 2004). Nesta linha, o presente trabalho buscou avaliar o papel da Gal-1 na dinâmica da produção de EROs e o impacto deste fenômeno em algumas funções biológicas de neutrófilos. Em neutrófilos não ativados ou *primed* (10^{-9} M fMLP), a Gal-1 não foi capaz de induzir a produção de EROs. Estes achados também foram descritos por outros autores, segundo os quais a Gal-1 e a Gal-3 induzem o metabolismo oxidativo apenas em neutrófilos ativados (ALMKVIST et al., 2002; ELOLA, CHIESA & FINK, 2005; KARLSSON et al. 1998). Além disso, foi possível demonstrar que há uma correlação positiva entre dose de Gal-1 e produção de EROs em neutrófilos ativados e que a propriedade lectínica da Gal-1 esteve associada à indução do metabolismo oxidativo como descrito previamente por ALMKVIST et al., 2002. Nessa linha, foi demonstrado que lectinas de origem vegetal que podem reconhecer carboidratos semelhantes aos reconhecidos por Gal-1, podem interagir diretamente com a “gp91phox” na superfície celular de neutrófilos e favorecer a produção de EROs por esses fagócitos (GORUDKO et al., 2011). Assim, futuros estudos deverão ser

realizados para investigar a possível interação da Gal-1 com a “gp91phox” e o impacto desta interação na regulação da produção de EROs por esta lectina de mamíferos.

Entretanto, na literatura ainda não há relatos sobre a interferência da Gal-1 na produção de EROs em neutrófilos ativados com repetidas doses de fMLP. Sabe-se que o tratamento sucessivo com fMLP reduz os níveis de produção de EROs por neutrófilos (PANARO; MITOLO, 1999); no entanto, a presença de Gal-1 não interferiu neste processo. O evento de auto-regulação do fMLP pode estar associado ao fenômeno de endocitose e/ou reciclagem de seu receptor, que pode determinar a ausência parcial ou total da resposta celular quando este estímulo é continuado (PANARO; MITOLO, 1999). Portanto, este resultado sugere que a Gal-1 induz a produção de EROs e não participa do processo de dessensibilização do receptor de fMLP em neutrófilos ativados. Ao contrário da Gal-1, a Gal-3 é capaz de induzir a produção de EROS em neutrófilos ativados e promover a dessensibilização do receptor de fMLP por favorecer a oxidação da metionina deste peptídeo via a ação da mieloperoxidase (FORSMAN, et al., 2008). Considerando que os protocolos utilizados neste trabalho diferem daqueles utilizados por FORSMAN e colaboradores (2008), futuros experimentos deveram ser realizados para o melhor entendimento desta aparente contradição.

Salienta-se que apesar da utilização de estímulos consecutivos, a manutenção da viabilidade celular dos neutrófilos foi observada em todos os tratamentos realizados na presença ou na ausência de Gal-1. De acordo com a literatura, a Gal-1 induz a ativação da NADPH oxidase (ALMKVIST et al., 2002) e promove a expressão de fosfatidilserina (FS) de modo reversível nas superfícies dessas células (STOWELL et al., 2009), o que favorece a fagocitose desses leucócitos por macrófagos sem promover a apoptose e/ou necrose (DIAS-BARUFFI et al., 2003). No presente trabalho, o tratamento de neutrófilos com Gal-1 foi responsável pela modulação positiva da fagocitose destas células por macrófagos, de modo dependente de sua atividade lectínica, o que sugere que esta proteína pode estar envolvida na remoção fagocítica de neutrófilos do sítio inflamatório. Ainda, como descrito na literatura, macrófagos que fagocitam células via o reconhecimento de FS podem apresentar um perfil funcional anti-inflamatório (SAVILL, 2002).

Nos neutrófilos ativados, a Gal-1 se liga preferencialmente em estruturas proteicas de 75-120KDa e 45KDa presentes nas membranas dos grânulos de gelatinase e de vesículas secretórias, respectivamente (ALMKVIST et al., 2002). Ainda, esta lectina é capaz de promover a desgranulação e a liberação de mieloperoxidase dos neutrófilos na presença de citocalasina B (ALMKVIST et al., 2002, ELOLA, CHIESA & FINK, 2005). Contudo, embora o processo de ativação ofereça diferentes receptores para Gal-1 e a ligação desta lectina seja maior em neutrófilos recolhidos do exsudato ou tratados com fMLP (ALMKVIST et al., 2002, DIAS-BARUFFI et al., 2003), COOPER e colaboradores (2008) não observaram o aumento da ligação da Gal-1 em neutrófilos estimulados com PAF (*platelet-activating factor*) ou após a ativação com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). Estes autores sugerem que o aumento de ligantes para Gal-1 na superfície dos neutrófilos não justifica sua ação sobre estas células em resposta a diferentes ativadores, uma vez que esta lectina é capaz de induzir influxo de cálcio em neutrófilos tanto ativados quanto não ativados (STOWELL et al., 2007).

O presente trabalho mostra que, em neutrófilos não ativados, a Gal-1 não induz a produção de EROs, mas modula negativamente o metabolismo oxidativo quando as células são ativadas com fMLP após serem tratadas com esta lectina. O efeito inibitório da Gal-1 em relação ao fMLP foi parcialmente revertido pelo TDG (49%) (açúcar hapteno específico para Gal-1), o que sugere que o efeito inibitório da Gal-1 na produção de EROs em células não ativadas pode estar associado a sua propriedade lectínica. Este efeito modulatório pode estar relacionado à capacidade da Gal-1 de regular vias de sinalização associadas à produção de EROs por neutrófilos como a via do NF- κ B e do RAS (FISHER et al., 2005, SUIRE et al., 2006, KIM; CHA, 2009, TOSCANO et al., 2011). Ainda, esta lectina pode desfavorecer a produção de EROs em neutrófilos não ativados por regular a localização de elementos de sinalização celular em microdomínios lipídicos da superfície celular “Lipid Rafts” (PRIOR et al., 2003) e estes microdomínios são importantes para a produção adequada de EROS por estes leucócitos (FUHLER et al., 2007). Com base nestes achados, sugere-se que a Gal-1 pode participar do ajuste da produção de EROs, desfavorecendo, por um lado, lesões teciduais mediadas pela produção de radicais livres na ausência de infecção (SMITH, 1994) e favorecendo, por outro, a eliminação de agentes infecciosos no local da inflamação por otimizar a produção de EROs de neutrófilos ativados (MAYER-SCHOLL et al., 2004).

Apesar de a Gal-1 induzir maior produção de EROs em neutrófilos ativados, *in vitro*, com fMLP, não foi possível demonstrar que o tratamento destes leucócitos com Gal-1 foi mais eficiente na eliminação de bactérias da cepa *E.coli* O86:B7. Ao contrário de galectinas 4 e 8, que podem interagir com a *E.coli* O86:B7 e eliminá-la (STOWELL et al., 2010), a Gal-1 não induz diretamente a morte desta cepa bacteriana. Considerando, ainda, que neutrófilos ativados com fMLP expressam um padrão de ligantes que possibilita o efeito da indução de EROs pela Gal-1 (ALMKVIST et al., 2002), sugere-se que a interação do neutrófilo com a cepa O86:B7 de *E.coli* pode levar à expressão de outros ligantes e, portanto, conduzir a uma resposta não relacionada à produção de EROs induzida por esta lectina. Entretanto, futuras investigações deverão ser realizadas visando ao melhor entendimento deste fenômeno.

Com base nos achados da Gal-1 sobre neutrófilos humanos *in vitro* e no fato de que estes fagócitos podem combater infecções bacterianas e/ou provocar lesão tecidual (SMITH, 1994), o próximo passo foi avaliar a participação desta lectina no modelo de sepse polimicrobiana induzida em camundongos destituídos ou não do gene da Gal-1. Camundongos Gal-1^{-/-} são mais sensíveis à sepse polimicrobiana moderada em relação aos selvagens. Na sepse os mecanismos de defesa são insuficientes para a contenção e eliminação do agente infeccioso no local da infecção (COHEN, 2002). Assim, no início da sepse agentes patogênicos (produtos destes agentes, elementos de necrose celular, alarminas, PAMPs e outros elementos) podem ganhar a circulação favorecendo a transição da resposta inflamatória normal no local da infecção para uma resposta inflamatória sistêmica conhecida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (COHEN, 2002; FRY, 2012). Na SIRS há a participação de citocinas (TNF- α e IL-1 β), leucotrienos, moléculas de adesão, quimocinas, EROs e óxido nítrico (NO). Posteriormente, ocorre a liberação: (i) de mediadores anti-inflamatórios como TGF- β e IL-10, (ii) de supressores da cascata de sinalização envolvida no reconhecimento de patógenos, (iii) de prostaglandinas e de hormônios (DINARELLO, 1997, MULLER KOBOLD et al., 2000, COHEN, 2002). Neste cenário, o recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso é um dos braços iniciais e o mais crítico da resposta imunológica inata (PINHEIRO da SILVA F; SORIANO, 2009). Contudo, para investigar o possível mecanismo que proporcionou uma maior mortalidade dos animais Gal-1^{-/-}, foi avaliado o recrutamento de neutrófilos no sítio de infecção após 6 horas. A

quantidade de neutrófilos determinada na cavidade peritoneal de camundongos Gal-1^{-/-} foi maior em relação à dos camundongos selvagens. Estes achados concordam com dados da literatura que mostram que a Gal-1 inibe a quimiotaxia, o rolamento e a adesão de neutrófilos ao endotélio ativado (COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008) e, conseqüentemente, provoca uma significativa diminuição da migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (LA et al., 2003). Embora a quantidade de neutrófilos fosse elevada na cavidade peritoneal nos camundongos Gal-1^{-/-}, no período de 6 horas, a carga bacteriana nesta cavidade também foi maior nestes animais em relação aos selvagens. Entretanto, curiosamente, o número de bactérias no sangue dos animais Gal-1^{-/-} foi menor do que nos animais Gal-1^{+/+}, sugerindo que os animais deficientes de Gal-1 foram mais eficientes em conter a infecção bacteriana na cavidade peritoneal. A carga bacteriana elevada no peritônio de animais Gal-1^{-/-}, no modelo de sepse moderada provocada por perfuração intestinal, pode estar associada a potencial participação da Gal-1 endógena na cicatrização do epitélio intestinal, uma vez que outras galectinas podem estar envolvidas neste processo (PACLIK et al., 2008). Além disso, este fenômeno poder ser consequência do comprometimento da homeostase do epitélio intestinal, da integridade da mucosa intestinal e da função de barreira deste epitélio (SANTUCCI et al., 2003, MUGLIA et al. 2011). A Gal-1 participa também do controle funcional de células TH₁, TH₁₇ e T regulatórias (TOSCANO et al., 2007; BLOIS et al., 2007; RABINOVICH; TOSCANO, 2009; GARIN et al., 2007). De modo interessante, foi demonstrado com o uso do modelo de CLP que a ativação exagerada de células T CD4 pode conduzir a um aumento da permeabilidade intestinal, maior atividade efetora de neutrófilos e uma eliminação de bactérias mais eficiente. Entretanto, o aumento na ativação de células T CD4 também provoca maior lesão tecidual e mortalidade dos animais (KASTEN et al., 2010). Este conjunto de informações pode justificar, parcialmente, a aparente contradição entre os achados de carga bacteriana, migração de neutrófilos e a menor resistência dos camundongos Gal-1^{-/-} à sepse moderada.

No presente trabalho, neutrófilos coletados do peritônio de camundongos Gal-1^{-/-} liberaram mais EROs, *in vitro*, em resposta ao fMLP e à Gal-1 exógena, quando comparados aos neutrófilos de animais selvagens. Sabe-se que EROs favorece a atividade microbicida de neutrófilos, o que pode parcialmente justificar os resultados obtidos *in vivo*, segundo os quais camundongos Gal-1^{-/-} infectados com bactérias isoladas do ceco de animais selvagens apresentaram maior atividade bactericida no

lavado peritoneal e no sangue. A interação Gal-1/agente infeccioso pode favorecer a eliminação ou o estabelecimento deste agente no hospedeiro (GARNER et al., 2010, OUELLET et al., 2005). Nessa linha, Gal-3 é capaz de interagir com LPS e inibir a ativação e a produção de citocinas por macrófagos induzidas por este agente. Entretanto, apesar de animais deficientes de Gal-3 serem mais susceptíveis ao choque induzido por LPS, eles são mais resistentes a infecção experimental por *Samonella minnesota* Re 595. O mecanismo pelo qual a Gal-3 favorece a infecção *in vivo* por esta bactéria não é totalmente conhecido, mas pode envolver a inibição da produção de EROs e modulação de uma resposta TH₁. Ainda, a interação da Gal-3 com glicanas da superfície desta bactéria pode “esconder” os sinais de perigo deste microrganismo e diminuir a resposta do hospedeiro contra esta infecção (LI et al., 2008). Ainda, as galectinas podem atuar como receptor de reconhecimento padrão (PRR) por reconhecer glicanas expressas nas superfícies de microrganismos semelhantes ou não a estruturas do hospedeiro (SATO et al. 2009). Apesar de Gal-1 e Gal-3 reconhecerem glicanas semelhantes ou idênticas (SATO et al., 2009), serão necessários novos estudos para descobrir se a Gal-1 também é capaz de interagir diretamente com bactérias e interferir na evolução de processos infecciosos disparados por estes agentes.

No modelo experimental de sepse moderada, a resposta inflamatória nos camundongos Gal-1^{-/-} pode estar associada ao maior número de neutrófilos e à produção elevada de EROs no foco infeccioso, contribuindo para aumentar o descontrole da resposta inflamatória, a severidade de lesões teciduais, e a taxa de mortalidade destes animais. Em processos infecciosos a expressão de galectina-1 pode estar elevada nos linfonodos (10 µM) e atuar como um DAMP (OUELLET et al. 2005, SATO et al., 2009). DAMPS são moléculas endógenas que alertam o sistema imunológico da presença de lesão tecidual provocada por insultos infecciosos ou estéreis conduzindo a inflamação e ao início do reparo tecidual (IZUSHI et al., 2006, PICCININI & MIDWOOD, 2010, MASON et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado que a deficiência do gene da Gal-1 provoca um aumento no grau de severidade de lesões oculares provocadas pela infecção com vírus herpes simples, e isto pode estar associado a um maior infiltrado de neutrófilos no sítio de infecção (RAJASAGI et al., 2012). Ainda nesta linha, a taxa de letalidade de animais deficientes de CCR2 submetidos à sepse severa é menor e isto está associado ao menor infiltrado tecidual de neutrófilos e a uma redução nos níveis séricos de

marcadores bioquímicos de lesão e disfunção de órgãos (SOUTO et al., 2011). Por outro lado, neutrófilos podem apresentar um papel imunomodulador via a liberação de IL-10 frente a um processo de infecção bacteriana, como em modelos experimentais de sepse moderada, e isto poderia regular negativamente a função de macrófagos e células dendríticas (ZHANG et al. 2009, OCUIN et al., 2011). Assim, considerando que a Gal-1 induz a produção de IL-10 e animais Gal-1^{-/-} produzem menos desta citocina imunoregulatória (VAN DER LEIJ et al., 2007, RAJASAGI et al., 2012), sugere-se que, provavelmente, os neutrófilos dos animais Gal-1^{-/-} possam produzir menos IL-10 favorecendo a ativação de macrófagos e de células dendríticas.

A provável elevação da resposta inflamatória aguda indicada pelo maior número de neutrófilos e a maior produção de radicais livres pode ter impedido a infecção sistêmica, pois a carga bacteriana detectada no sangue dos animais Gal-1^{-/-} foi menor. Portanto, estes resultados sugerem a participação da Gal-1 endógena no controle da infecção em animais selvagens submetidos à sepse moderada. Deste modo, a resposta imunológica diante da infecção pode ser dependente da carga bacteriana e, ainda, a Gal-1 parece estar envolvida na modulação do processo inflamatório inicial. Sabe-se também que a Gal-1 inibe a liberação do AA e diminui a expressão da iNOs em macrófagos (CORREA et al., 2003).

Na sepse, ocorre o aumento da atividade da iNOs e a produção de NO, que atua como um importante modulador da migração de neutrófilos, inibindo a ligação destes leucócitos ao endotélio, além de interagir com outras moléculas, inclusive as espécies reativas do oxigênio (BENJAMIM et al., 2000). O resultado da transformação do O₂⁻ em peroxinitrito (ONOO⁻) pelo NO consiste na inibição da polimerização do citoesqueleto de actina, da migração, da fagocitose e da atividade da NADPH oxidase ex-vivo (CLEMENTS et al., 2003, TORRES-DUEÑAS et al., 2007). Múltiplos mecanismos são responsáveis pela hiporresponsividade e pela inibição do recrutamento de neutrófilos na sepse.

Sabe-se que pacientes com sepse apresentam, após 24 horas, um padrão de hiporresponsividade a estímulos inflamatórios associados à menor expressão de genes envolvidos na síntese de receptores do tipo *toll* (receptores de moléculas associadas ao dano tecidual-DAMPs) e ao NF-κB (TANG et al., 2007). Entretanto, na sepse, em resposta à presença de mediadores inflamatórios, ocorre um aumento na rigidez da membrana celular do neutrófilo. Como resultado da alteração

morfológica e do aumento da deposição de F-actina, os neutrófilos acabam sendo sequestrados em órgãos secundários distantes do local da infecção, principalmente no pulmão (DROST et al, 1999). Uma vez no pulmão, ocorre oclusão vascular devido à deficiência na transmigração destas células, resultando em isquemia e em consequente falência múltipla de órgãos (COHEN, 2002). *In vitro*, esta rigidez da membrana do neutrófilo pode ser induzida por fMLP ou TNF- α e está associada ao acúmulo de F-actina abaixo da membrana celular (DROST et al, 1999). No entanto, a ausência de Gal-1 endógena não promoveu um maior acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar dos animais Gal-1^{-/-} em relação aos selvagens. Este fato pode estar associado às características do modelo de sepse utilizado, uma vez que o acúmulo de neutrófilos no pulmão é claramente detectado na sepse severa e não na sepse moderada (TAVARES-MURTA et al., 2002, ALVES-FILHO et al., 2006; 2008).

Com base neste conjunto de resultados foi possível demonstrar que a Gal-1, exógena e endógena, pode regular positiva ou negativamente a produção de EROs por neutrófilos em resposta ao fMLP por meio de um mecanismo dependente do reconhecimento de carboidrato. Ainda, sugerimos que as propriedades imunoregulatórias da Gal-1 podem ser importantes na resolução de processos infecciosos e/ou nas lesões teciduais provocadas por infecções bacterianas. Portanto, a continuidade deste projeto irá contribuir para o entendimento do papel da Gal-1 na modulação da resposta imunológica no modelo de sepse moderada, além de elucidar o impacto biológico desta lectina na homeostase de neutrófilos e gerar subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de outras patologias infecciosas.

5. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Critical care medicine**, New York, Kolen, v.35, n.10, Oct, p.2408-16, 2007.

ALMKVIST, J.; DAHLGREN, C.; LEFFLER, H.; KARLSSON, A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. **Journal of immunology**, Baltimore, v.168, n.8, p.4034-41, 2002.

ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F.Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical care medicine**, New York, Kolen, Feb; 34 (2), p.461-70, 2006.

ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, Augusta, GA, v.30, Suppl 1, Oct, p.3-9, 2008.

ARROYO, A.; MODRIANSKY, M.; SERINKAN, F.B.; BELLO, R.I.; MATSURA, T.; JIANG, J.; TYURIN, V.A.; TYURINA, Y.Y.; FADEEL, B.; KAGAN, V.E. NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.20, p.277, n.51, p.499 65-75, 2002.

ASSARI T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. **Medical immunology**, London, Sep 21; 5:4, 2006.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, N.Y., Mar 1; 93 (5), p.1464-76, 1999.

BABIOR, B.M. The leukocyte NADPH oxidase. **The Israel Medical Association journal**, Ramat Gan, Israel, Nov; 4 (11), p.1023-4, 2002.

BAEUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, Massachusetts, Oct 4; 87 (1), p.13-20, 1996.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **The New England journal of medicine**, Apr 10; 336 (15), p.1066-71, 1997.

BARONDES, S.H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D.N.; CUMMINGS, R.D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M.A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, Massachusetts, v.76, n.4, p.597-8, 1994.

BARRIONUEVO, P.; BEIGIER-BOMPADRE, M.; ILARREGUI, J.M.; TOSCANO, M.A.; BIANCO, G.A.; ISTURIZ, M.A.; RABINOVICH, G.A. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. **Journal of immunology**, Baltimore, Jan 1; n.178 (1), p.436-45, 2007.

BAUM, L.G.; BLACKALL, D.P.; ARIAS-MAGALLANO, S.; NANIGIAN, D.; UH, S.Y.; BROWNE, J.M.; HOFFMANN, D.; EMMANOUILIDES, C.E.; TERRITO, M.C.; BALDWIN, G.C. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. **Clinical immunology**, Orlando, Dec; 109 (3), p.295-307, 2003.

BAUM, L.G.; PANG, M.; PERILLO, N.L.; WU, T.; DELEGEANE, A.; UITTENBOGAART, C.H.; FUKUDA, M.; SEILHAMER, J.J. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. The **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.181 (3), p.877-87, 1995.

BENJAMIM, C.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, Jul; 182 (1), p.214-23, 2000.

BLASER, C.; KAUFMANN, M.; MÜLLER, C.; ZIMMERMANN, C.; WELLS, V.; MALLUCCI, L.; PIRCHER, H. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.28 (8), p.2311-9, 1998.

BLEIBLO, F.; MICHAEL, P.; BRABANT, D.; RAMANA, C.V.; TAI, T.; SALEH, M.; PARRILLO, J.E.; KUMAR, A. The role of immunostimulatory nucleic acids in septic shock. **International journal of clinical and experimental medicine**, Madison, WI, v.5 (1), p.1-23, 2012.

BLOIS SM, ILARREGUI JM, TOMETTEN M, GARCIA M, ORSAL AS, CORDO-RUSSO R, TOSCANO MA, BIANCO GA, KOBELT P, HANDJISKI B, TIRADO I, MARKERT UR, KLAPP BF, POIRIER F, SZEKERES-BARTHO J, RABINOVICH GA, ARCK PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. **Nature medicine**, New York, Dec; 13 (12), p.1450-7, 2007.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, New York, N. Y., May 15; 89 (10), p.3503-21, 1997.

BORREGAARD, N.; SORENSEN, O.E.; THEILGAARD-MONCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 8, p. 340-345, 2007.

BOSCHER, C.; DENNIS, J.W.; NABI, I.R. Glycosylation, galectins and cellular signaling. **Current opinion in cell biology**, Philadelphia, PA, Aug; 23 (4), p.383-92, 2011.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D.S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, New York, N.Y, Mar 5; 303 (5663), p.1532-5, 2004.

BROWN, E.J. Phagocytosis. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Cambridge, UK, Feb; 17 (2), p. 109-17, 1995.

CAMBY, I.; LE MERCIER, M.; LEFRANC, F.; KISS, R. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, New York, v.16 n.11, p.137-157, 2006.

CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O.L.; ESPEVIK, T.; HARBOE, M.; MOLLNES, T.E. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, Jun; 69 (6), p.479-91, 2009.

CERRI DG, RODRIGUES LC, STOWELL SR, ARAUJO DD, COELHO MC, OLIVEIRA SR, BIZARIO JC, CUMMINGS RD, DIAS-BARUFFI M, COSTA MC. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. **Glycobiology**, Oxford, New York, Nov:18 (11), p.842-50, 2008.

CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; FRUNZIO, R.; BRUNI, C.B. Galectin genes: regulation of expression. **Glycoconjugate Journal**, Norwell, v.19 (7-9), p.441-9, 2004.

CHO, M.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270 (10), p.5207-121995.

CLEMENTS, M.K.; SIEMSEN, D.W.; SWAIN, S.D.; HANSON, A.J.; NELSON-OVERTON, L.K.; ROHN, T.T.; QUINN, M.T. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. **Journal of leukocyte biology**, New York, Mar; 73 (3), p.344-55, 2003.

COHEN, H.J.; CHOVANIEC, M.E.; WILSON, M.K.; NEWBURGER, P.E. Con-A stimulated superoxide production by granulocytes: reversible activation of NADPH-oxidase. **Blood**, Oxford, New York, v.60, p.1188–1194, 1982.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, London, v.420, p.885–891, 2002.

COOPER, D.; NORLING, L.V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **Journal of leukocyte biology**, New York, Jun; 83 (6), p.1459-66, 2008.

COOPER, D.N.; BARONDES, S.H. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.110 (5), p.1681-91, 1990.

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 resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, Oxford, New York, Feb; 13 (2), p.119-28, 2003.

CUMMINGS, R.D.; LIU, F.T. GALECTINS, CHAPTER 33. IN: VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J.D.; FREEZE, H.H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C.R.; HART, G.W.; ETZLER, M.E.; EDITORS. **Essentials of Glycobiology**, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., New York, 2009.

DIAS-BARUFFI, M.; BOCHKAREVA, E.; ROGERS, K.; STOWELL, S.; BOCHKAREV, A.; CUMMINGS, R.D. Crystal structures of human galectin-1 with low molecular weight ligands at 1.6-1.9 Å, and analysis of the ligand binding affinity to galectin-1 determined by isothermal titration calorimetry. **Glycobiology**, Oxford, New York, v.12 (10), p.701-701, 2002.

DIAS-BARUFFI M, STOWELL SR, SONG SC, ARTHUR CM, CHO M, RODRIGUES LC, MONTES MA, ROSSI MA, JAMES JA, MCEVER RP, CUMMINGS RD. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. **Glycobiology**, Oxford, New York, May; 20 (5), p.507-20, 2010.

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; CHO, M.; KARMAKAR, S.; MC EVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without inducing Apoptosis. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.278, p.41282-93, 2003.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, Chicago, Dec; 112 (6 Suppl), p.321S-329S, 1997.

DODD, R.B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, Oxford, New York, v.11, p.71R-79R, 2001.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.263, p.9557-9560, 1988.

DROST, E.M.; KASSABIAN, G.; MEISELMAN, H.J.; GELMONT, D.; FISHER, T.C. Increased rigidity and priming of polymorphonuclear leukocytes in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, Jun; 159 (6), p.1696-702, 1999.

ELOLA, M. T.; FINK, N.E. Galectin-1 can stimulate superoxide production in human neutrophils [on line]. *Electr. Lectin J. Lectin Biol. Biochem. Clin. Biochem.* 13. Available at: <http://www.plab.ku.dk/tcbh/Lectins13/ElolaFink/paper.html>, 1999.

ELOLA, M.T.; CHIESA, M.E.; FINK, N.E. Activation of oxidative burst and degranulation of porcine neutrophils by a homologous spleen galectin-1 compared to N-formyl-L-methionyl-L leucyl-L-phenylalanine and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, May; 141 (1), p.23-31, 2005.

FADEEL, B.; AHLIN, A.; HENTER, J.I.; ORRENIUS, S.; HAMPTON, M.B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. **Animal blood groups and biochemical genetics**, New York, N.Y., v.92, p.4808-18, 1998.

FAJKA-BOJA, R.; SZEMES, M.; ION, G.; LÉGRÁDI, A.; CARON, M.; MONOSTORI, E. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. **Immunology letters**, Amsterdam, Jun 3; 82 (1-2), p.149-54, 2002.

FISCHER C, SANCHEZ-RUDERISCH H, WELZEL M, WIEDENMANN B, SAKAI T, ANDRÉ S, GABIUS HJ, KHACHIGIAN L, DETJEN KM, ROSEWICZ S. Galectin-1 interacts with the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, Nov 4; 280 (44), p.37266-77, 2005.

FUHLER GM, BLOM NR, COFFER PJ, DRAYER AL, VELLENGA E. The reduced GM-CSF priming of ROS production in granulocytes from patients with myelodysplasia is associated with an impaired lipid raft formation. **Journal of leukocyte biology**, New York, Feb; 81 (2), p.449-57, 2007.

FORSMAN H, SALOMONSSON E, ONNHEIM K, KARLSSON J, BJÖRSTAD A, LEFFLER H, BYLUND J, KARLSSON A, DAHLGREN C. The beta-galactoside binding immunomodulatory lectin galectin-3 reverses the desensitized state induced in neutrophils by the chemotactic peptide f-Met-Leu-Phe: role of reactive oxygen species generated by the NADPH-oxidase and inactivation of the agonist. **Glycobiology**, New York, Nov; 18 (11), p.905-12, 2008.

FRY DE. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. **The American surgeon**, Atlanta Ga, Jan; 78 (1), p.1-8, 2012.

GARÍN MI, CHU CC, GOLSHAYAN D, CERNUDA-MOROLLÓN E, WAIT R, LECHLER RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. **Blood**, New, York, Mar 1; 109 (5), p.2058-65, 2007.

GARNER OB, AGUILAR HC, FULCHER JA, LEVRONEY EL, HARRISON R, WRIGHT L, ROBINSON LR, ASPERICUETA V, PANICO M, HASLAM SM, MORRIS HR, DELL A, LEE B, BAUM LG. Endothelial galectin-1 binds to specific glycans on nipah virus fusion protein and inhibits maturation, mobility, and function to block syncytia formation. **PLoS pathogens**, San Francisco, CA, Jul 15; 6(7), p.e10009932010, 2010.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, Cambridge, Apr; 109 Suppl: S81-96, 2002.

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**, Basel, v.55, n.3, p.99-107, 2006a.

GIL, C.D.; GULLO, C.E.; OLIANI, S.M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **International journal of clinical and experimental pathology**, Madison, WI, Dec 20; 4 (1), p.74-84, 2010.

GIL, C.D.; LA, M.; PERRETTI, M.; OLIANI, S.M. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell biology international**, London, UK, v.30, n.4, p.338-44, 2006b.

GORUDKO IV, MUKHORTAVA AV, CARAHER B, REN M, CHERENKEVICH SN, KELLY GM, TIMOSHENKO AV. Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. **Archives of biochemistry and biophysics**, Dec 15; 516 (2), p.173-81, 2011.

GU, M.; WANG, W.; SONG, W.K.; COOPER, D.N.; KAUFMAN, S.J. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. **Journal of cell science**, London, Jan;107 (Pt 1), p.175-81, 1994.

HÄGER, M.; COWLAND, J.B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of internal medicine**, Oxford, Jul; 268 (1), p.25-34, 2010.

HALLETT, M.B.; LLOYDS, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. **Immunology today**, Amsterdam, Jun; 16 (6), p.264-8, 1995.

HERNANDEZ, J.D.; NGUYEN, J.T.; HE, J.; WANG, W.; ARDMAN, B.; GREEN, J.M.; FUKUDA, M.; BAUM, L.G. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. **Journal of immunology**, Baltimore, Oct 15; 177 (8), p.5328-36, 2006.

HUDGIN, R.L.; PRICER, W.E. JR.; ASHWELL, G.; STOCKERT, R.J.; AND MORELL, A.G. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.249, p.5536–5543, 1974.

IZUISHI K, TSUNG A, JEYABALAN G, CRITCHLOW ND, LI J, TRACEY KJ, DEMARCO RA, LOTZE MT, FINK MP, GELLER DA, BILLIAR TR. Cutting edge: high-mobility group box 1 preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury. **Journal of immunology**, Baltimore, Jun 15; 176 (12), p.7154-8, 2006.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **Journal of intensive care medicine**, Boston, MA, Mar-Apr; 22 (2), p.63-72, 2007.

JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, New York, NY, v. 57:1, p. 46, 1992.

JUSZCZYNSKI, P.; OUYANG, J.; MONTI, S.; RODIG, S.J.; TAKEYAMA, K.; ABRAMSON, J.; CHEN, W.; KUTOK, J.L.; RABINOVICH, G.A.; SHIPP, M.A. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.104 (32), p.13134-9, 2007.

KARLSSON A, FOLLIN P, LEFFLER H, DAHLGREN C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. **Blood**, New York, May 1; 91 (9), p.3430-8, 1998.

KARMAKAR, S.; CUMMINGS, R.D.; MCEVER, R.P. Contributions of Ca²⁺ to galectin-1-induced exposure of phosphatidylserine on activated neutrophils. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v.31, p.28623-31, 2005.

KASTEN KR, TSCHÖP J, ADEDIRAN SG, HILDEMAN DA, CALDWELL CC. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. **Shock**, Augusta, GA, Oct; 34 (4), p.327-36, 2010.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1572, p.187-197, 2002.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International immunopharmacology**, Amsterdam; New York, Nov; 10 (11), p.1325-34, 2010.

KURIHARA D, UENO M, TANAKA T, YAMASHITA T. Expression of galectin-1 in immune cells and glial cells after spinal cord injury. **Neuroscience research**, New York, Mar; 66 (3), p.265-70, 2012.

LA, M.; CAO, T.V.; CERCHIARO, G.; CHILTON, K.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; OLIANI, S.M.; CHERNAJOVSKY, Y.; PERRETTI, M. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.163 (4), p.1505-1515, 2003.

LI Y, KOMAI-KOMA M, GILCHRIST DS, HSU DK, LIU FT, SPRINGALL T, XU D. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. **Journal of immunology**, Baltimore, Aug 15; 181(4), p.2781-2789, 2008.

LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1183, p.158-82, 2010.

LOHR, M.; LENSCH, M.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H.C.; SMETANA, K.JR; SINOWATZ, F, GABIUS, H.J. Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1, -2 and -7: comparative profiling of gene/ promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistry. **Folia biologica**, Praha, v.53 (4), p.109-28, 2007.

LOPEZ-LUCENDO, M.F.; SOLIS, D.; ANDRÉ, S.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KALTNER, H.; GABIUS, H.J.; ROMERO, A. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterization of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **Journal of molecular biology**, Amsterdam, v.343, p.957-970, 2004.

MANSON J, THIEMERMANN C, BROHI K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. **The British journal of surgery**, Bristol, England, Jan; 99 Suppl 1:12-20, 2012.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current opinion in microbiology**, London; New York, Feb;7 (1):62-6, 2004.

MOTRAN, C.C.; MOLINDER, K.M.; LIU, S.D.; POIRIER, F.; MICELI, M.C. Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2

function. **European journal of immunology**, Weinheim, v.38 (11), p.3015-3027, 2008.

MUGLIA C, MERCER N, TOSCANO MA, SCHATTNER M, POZNER R, CERLIANI JP, GOBBI RP, RABINOVICH GA, DOCENA GH. The glycan-binding protein galectin-1 controls survival of epithelial cells along the crypt-villus axis of small intestine. **Cell death & disease**, London, May 26; 2:e163, 2011.

MULLER KOBOLD, A.C.; TULLEKEN, J.E.; ZIJLSTRA, J.G.; SLUITER, W.; HERMANS, J.; KALLENBERG, C.G.; TERVAERT, J.W. Leukocyte activation in sepsis: correlations with disease state and mortality. **Intensive care medicine**, Berlin, New York, v.26, p.883–892, 2000.

NGUYEN, J.T.; EVANS, D.P.; GALVAN, M.; PACE, K.E.; LEITENBERG, D.; BUI, T.N.; BAUM, L.G. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. **Journal of immunology**, Baltimore, Nov 15; 167 (10), p.5697-707, 2001.

OCUIN LM, ZUBIN M. BAMBOAT, VINOD P. BALACHANDRAN, MICHAEL J. CAVNAR, HEBROON OBAID, GEORGE PLITAS, AND RONALD P. DEMATTEO. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. **Journal of leukocyte biology**, New York, March; 89 (3), p.423–432, 2011.

OFFNER, H.; CELNIK, B.; BRINGMAN, T.S.; CASENTINI-BOROCZ, D.; NEDWIN, G.E.; VANDENBARK, A.A. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.28 (2), p.177-84, 1990.

OUELLET M, MERCIER S, PELLETIER I, BOUNOU S, ROY J, HIRABAYASHI J, SATO S, TREMBLAY MJ. Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. **Journal of immunology**, Baltimore, Apr 1; 174 (7):4120-6, 2005.

PACE, K.E.; HAHN, H.P.; PANG, M.; NGUYEN, J.T.; BAUM, L.G. CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. **Journal of immunology**, Baltimore, v.165 (5), p.2331-2334, 2000.

PACE, K.E.; LEE, C.; STEWART, P.L.; BAUM, L.G. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1, **Journal of immunological methods**, Baltimore, v.163, p.3801-11, 1999.

PACLIK D, LOHSE K, WIEDENMANN B, DIGNASS AU, STURM A. Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. **Inflammatory bowel diseases**, New York, NY, Oct; 14 (10), p. 1366-72, 2008.

PANARO, M.A.; MITOLO, V. Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, New York, N.Y., Aug; 21 (3), p.397-419, 1999.

PATNAIK, S.K.; POTVIN, B.; CARLSSON, S.; STURM, D.; LEFFLER, H.; STANLEY, P. Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. **Glycobiology**, Oxford, New York, Apr; 16 (4), p. 305-17, 2006.

PHAM, C.T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature reviews. Immunology**, London, UK., Jul; 6 (7), p.541-50, 2006.

PICCININI AM, MIDWOOD KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators of inflammation**, Oxford, UK, pii: 672395, 2010.

PINHEIRO da SILVA, F.; SORIANO, F.G. Neutrophils recruitment during sepsis: critical points and crossroads. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, Fla., v.14, p.4464–4476, 2009.

PRIOR IA, MUNCKE C, PARTON RG, HANCOCK JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. **The Journal of cell biology**, New York, Jan 20; 160 (2), p.165-70, 2003.

RABINOVICH GA, TOSCANO MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, London, UK, v.9, p. 338–352, 2009.

RABINOVICH, G.; CASTAGNA, L.; LANDA, C.; RIERA, C.M.; SOTOMAYOR, C. Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.59 (3), p.363-70, 1996.

RABINOVICH, G.A.; ALONSO, C.R.; SOTOMAYOR, C.E.; DURAND, S.; BOCCO, J.L.; RIERA, C.M. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. **Cell Death and Differentiation**, London, v.7 (8), p.747-53, 2000a.

RABINOVICH, G.A.; DALY, G.; DREJA, H.; TAILOR, H.; RIERA, C.M.; HIRABAYASHI, J.; CHERNAJOVSKY, Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. **The Journal of experimental medicine**, New York, v.190 (3), p.385-98, 1999.

RABINOVICH, G.A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M.A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, Sep 19; 1572 (2-3), p.274-84, 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**, Weinheim, v.30 (5), p.1331-1339, 2000b.

RAJASAGI NK, SURYAWANSHI A, SEHRAWAT S, REDDY PB, MULIK S, HIRASHIMA M, ROUSE BT. Galectin-1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunopathological lesions. **Journal of immunology**, Baltimore, May 1; 188 (9), p.4631-43, 2012.

ROOS, D.; DE BOER, M.; KURIBAYASHI, F.; MEISCHL, C.; WEENING, R.S.; SEGAL, A.W.; AHLIN, A.; NEMET, K.; HOSSLE, J.P.; BERNATOWSKA-MATUSZKIEWICZ, E.; MIDDLETON-PRICE, H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Animal blood groups and biochemical genetics**, New York, N.Y., v.1, p.87, n.5, p.1663-81, 1996.

RUBINSTEIN, N.; ILARREGUI, J.M.; TOSCANO, M.A.; RABINOVICH, G.A. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**, Copenhagen, Jul; 64 (1), p.1-12, 2004.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; CAMMILLERI, F.; SERVILLO, G.; FEDERICI, B.; MORELLI, A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, Hoboken, v.31 (2), p.399-406, 2000.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; RUBINSTEIN, N.; MENCARELLI, A.; PALAZZETTI, B.; FEDERICI, B.; RABINOVICH, G.A.; MORELLI, A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.124 (5), p. 1381-1394, 2003.

SATO, S.; BURDETT, I.; HUGHES, R.C. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **Experimental cell research**, New York, v. 207, n.1, p.8-18, 1993.

SATO, S.; ST-PIERRE, C.; BHAUMIK, P.; NIEMINEN, J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunological reviews**, Copenhagen, Jul; 230 (1), p.172-87, 2009.

SAVILL J, DRANSFIELD I, GREGORY C, HASLETT C. A blast from the past: clearance apoptotic cells regulates immune responses. **Nature reviews. Immunology**, London, UK, Dec; 2 (12), p.965-75, 2002.

SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. **Annual review of immunology**, Palo Alto, Calif., v.23, p.197-223, 2005.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.18, p.221-226, 1993.

SMITH JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of leukocyte biology**, New York, Dec; 56 (6), p.672-86, 1994.

SOUTO FO, ALVES-FILHO JC, TURATO WM, AUXILIADORA-MARTINS M, BASILE-FILHO A, CUNHA FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, NY, Jan 15; 183 (2), p.234-42, 2011.

STOCKERT, R.J.; MORELL, A.G.; SCHEINBERG, I.H. Mammalian hepatic lectin. **Science**, New York, N.Y, v.186, p.365-366, 1974.

STOWELL, S.R.; ARTHUR, C.M.; DIAS-BARUFFI, M.; RODRIGUES, L.C.; GOURDINE, J.P.; HEIMBURG-MOLINARO, J.; JU, T.; MOLINARO, R.J.; RIVERA-MARRERO, C.; XIA, B.; SMITH, D.F.; CUMMINGS, R.D. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. **Nature Medicine**, New York, v.16 (3), p.295-301, 2010.

STOWELL, S.R.; DIAS-BARUFFI, M.; PENTTILA, L.; RENKONEN, O.; NYAME, A.K.; CUMMINGS, R.D. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, Oxford, New York, v.14 (2), p.157-67, 2004.

STOWELL, S.R.; KARMAKAR, S.; ARTHUR, C.M.; JU T.; RODRIGUES, L.C.; RIUL, T.B.; DIAS-BARUFFI, M.; MINER, J.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. **Molecular biology of the cell**, Bethesda, MD, Mar; 20 (5), p.1408-18, 2009.

STOWELL, S.R.; KARMAKAR, S.; STOWELL, C.J.; DIAS-BARUFFI, M.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. **Blood**, New York, v.109 (1), p.219-227, 2007.

STRNAD, J.; BURKE, J.R. IkappaB kinase inhibitors for treating autoimmune and inflammatory disorders: potential and challenges. **Trends in pharmacological sciences**, Amsterdam, Mar; 28 (3), p.142-8, 2007.

SUIRE S, CONDLIFFE AM, FERGUSON GJ, ELLSON CD, GUILLOU H, DAVIDSON K, WELCH H, COADWELL J, TURNER M, CHILVERS ER, HAWKINS PT, STEPHENS L. Gbetagammagmas and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. **Nature cell biology**, London, Nov; 8 (11), p.1303-9, 2006.

TANG, B.M.; MCLEAN, A.S.; DAWES, I.W.; HUANG, S.J.; LIN, R.C. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, Oct 1;176 (7), p.676-84, 2007.

TAVARES-MURTA, B.M.; ZAPAROLI, M.; FERREIRA, R.B.; SILVA-VERGARA, M.L.; OLIVEIRA, C.H.; MURTA, E.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Critical care medicine**, New York, Kolen, May; 30 (5), p. 1056-61, 2002.

TEICHBERG, V.I.; SILMAN, I.; BEITSCH, D.D.; AND RESHEFF, G. A β -D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v.72, p.1383–1387, 1975.

TIMOSHENKO, A.V.; KAYSER, K.; DRINGS, P.; KOLB, G.; HAVEMANN, K.; GABIUS, H.J. Modulation of lectin-triggered superoxide release from neutrophils of tumor patients with or without chemotherapy. **Anticancer research**, Athens, v.13, p.1789–1792, 1993.

TORRES-DUEÑAS, D.; CELES, M.R.; FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SPILLER, F.; DAL-SECCO, D.; DALTO, V.F.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **British journal of pharmacology**, London, Oct; 152 (3), p.341-52, 2007.

TOSCANO, M. A.; BIANCO, G.A.; ILARREGUI, J.M.; CROCI, D.O.; CORREALE, J.; HERNANDEZ, J.D.; ZWIRNER, N.W.; POIRIER, F.; RILEY, E.M.; BAUM, L.G.; RABINOVICH, G.A. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature Immunology**, New York, v.8 (8), p.825-834, 2007.

TOSCANO, M.A.; CAMPAGNA, L.; MOLINERO, L.L.; CERLIANI, J.P.; CROCI, D.O.; ILARREGUI, J.M.; FUERTES, M.B.; NOJEK, I.M.; FEDEDA, J.P.; ZWIRNER, N.W.; COSTAS, M.A.; RABINOVICH, G.A. Nuclear factor (NF)- κ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. **Molecular immunology**, Oxford, Elmsford, N. Y., Sep; 48 (15-16), p.1940-9, 2011.

TOSCANO, M.A.; COMMODARO, A.G.; ILARREGUI, J.M.; BIANCO, G.A.; LIBERMAN, A.; SERRA, H.M.; HIRABAYASHI, J.; RIZZO, L.V.; RABINOVICH, G.A. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2 and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.176 (10), p.6323-32, 2006.

VAN DER LEIJ J, VAN DEN BERG A, HARMS G, ESCHBACH H, VOS H, ZWIERS P, VAN WEEGHEL R, GROEN H, POPPEMA S, VISSER L. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. **Molecular immunology**, Oxford, Jan; 44 (4), p.506-13, 2007.

VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO. J.; FREEZE, H.H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C.R.; HART, G.W.; ETZLER, M.E. **Essentials of Glycobiology**. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., New York, 2009.

VESPA, G.N.; LEWIS, L.A.; KOZAK, K.R.; MORAN, M.; NGUYEN, J.T.; BAUM, L.G.; MICELI, M.C. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.162 (2), p.799-806, 1999.

VYAKARNAM, A.; DAGHER, S.F.; WANG, J.L.; PATTERSON, R.J. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. **Molecular and cellular biology**, Washington, D.C., Aug; 17 (8), p.4730-7,1997.

VYAKARNAM, A.; LENNEMAN, A.J.; LAKKIDES, K.M.; PATTERSON, R.J.; WANG, J.L. A comparative nuclear localization study of galectin-1 with other splicing components. **Experimental cell research**, New York, Aug 1; 242 (2), p.419-28, 1998.

WALZEL, H.; SCHULZ, U.; NEELS, P.; BROCK, J. Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. **Immunology letters**, Amsterdam, Apr 15; 67 (3), p.193-202, 1999.

WANG, L.; FRIESS, H.; ZHU, Z.; FRIGERI, L.; ZIMMERMANN, A.; KORC, M.; BERBERAT, P.O.; BÜCHLER, M.W. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, Baltimore, Aug; 80 (8), p.1233-41, 2000.

WILLIAMS, M.R.; AZCUTIA, V.; NEWTON, G.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F.W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends in Immunology**, Oxford, Oct; 32 (10), p.461-9, 2011.

ZHANG X, MAJLESSI L, DERIAUD E, LECLERC C, LO-MAN R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. **Immunity**. Cambridge, MA, Nov 20; 31(5), p.761-71, 2009.

ZUÑIGA, E.; RABINOVICH, G.A.; IGLESIAS, M.M.; GRUPPI, A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.70 (1), p.73-9, 2001.