UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO

***Participação da galectina-1 na lesão
vascular induzida em camundongos com
hiperhomocisteinemia moderada***

HELDER HENRIQUE PAIVA

Ribeirão Preto
2007

HELDER HENRIQUE PAIVA

***Participação da galectina-1 na lesão
vascular induzida em camundongos com
hiperhomocisteinemia moderada***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do título de mestre em Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto
2007

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Paiva, Helder Henrique

Participação da galectina-1 na lesão vascular induzida em camundongos com hiperhomocisteinemia moderada / Helder Henrique Paiva; orientador Marcelo Dias Baruffi. --Ribeirão Preto, 2007
155.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Helder Henrique Paiva**

Título: **Participação da galectina-1 na lesão vascular induzida em camundongos com hiperhomocisteinemia moderada**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Programa em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em/...../.....

Dedico essa vitória, principalmente, a minha mãe, heroína Henriqueta e, partilho dessa imensa felicidade entre ela e meus irmãos Antonielle e Leandro, por minha gratidão de criação, caráter e dignidade.

A vocês que, com amor, ajudaram-me a trilhar minha jornada em busca da Luz.

Agradecimientos

Inúmeras pessoas, por esse trabalho, são merecedoras de agradecimentos.

À minha mãe sou inteiramente agradecido por sua determinação feroz em criar seus filhos contra quaisquer adversidades que se fizessem. Uma mulher ímpar, santificada por mim, agradeço toda devoção de amor, empenho de batalha, confiança e segurança. A você, minha mãe, só posso te dizer *TE AMO!*

Ao professor Marcelo Dias Baruffi, meu muitíssimo obrigado pelo carinho paterno como sempre fui recebido, em seu laboratório ou no pessoal. Amizade se constrói por confiança e respeito. Nesses quatro anos em que estamos trabalhando juntos pude aprender muito. Da Ciência, do profissional, pude extrair qualidades que serei sempre grato a você, amigo, "paizão".

À minha mulher, amante, confidente e, acima de tudo, amiga Raquel, agradeço pelo carinho, ajuda, amor, amor, amor e amor. Sua ajuda benevolente, desprendida e sempre bem-vinda foi e é de grande importância em todos os momentos. Você sabe cuidar de mim melhor que eu sei. Você me completa, me inflaciona e faz de mim um cara sempre e mais feliz. Te amo muito!

Aos companheiros de trabalho sou muito agradecido pela ajuda, apoio, conselhos e amizade. Nossos laços foram sempre maiores que o de trabalho. Nesses anos pudemos conhecer muito uns dos outros, entre choros, ombros amigos, churrascos, jantares e PGs (programas de gordo).

À Marlise, minha amiga pentelha, muito obrigado por ser assim, tão disponível, irmã e bondosa.

Lílian, pessoinha singular, amicíssima e sempre prestimosa. Obrigado por bagunçar sempre minhas coisas!

Juliana, parceira, versão feminina da minha parte balada, Silvão. Pau para toda obra! Obrigado pela parceria. *Sai fora Ju!*

Daniel, meu amigo Fifi, pessoas de caráter igual ao seu são raras. O prazer foi todo meu em poder trabalhar com você.

Nathalia, nossa amizade é engraçada. Gosto muito de lhe cutucar! Mas admiro muito você por sua inteligência, interesse e esforço.

Ao amigo Rubens meu obrigado pela assessoria nos experimentos com animais, por fornecer sempre o material de trabalho e pela conversa amiga.

Aos estagiários, Talita, Willian e Juliana, obrigado por me agüentarem, ouvindo-me explicando, pedindo ou reclamando. Obrigado também pelas ajudas na realização de experimentos.

Agradeço ao meu amigo Henrique de Paula Lemos, pela ajuda de colaboração nesse projeto e pela grande amizade.

À equipe dos laboratórios das professoras Dra. Regina Torquetti Toloí, Dra. Lúcia Helena Faccioli, Dra. Luciana Pereira Simon Crott, Dra. Sueli Vilela Sampaio e Dra. Ana Maria Oliveira, pelo fornecimento de reagentes, instrumentos e auxílio técnico científico.

Agradeço a funcionária Vani da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) por me atender com minhas urgências em fazer cortes histológicos. Obrigado também às funcionárias Mônica e Lena do departamento de Morfologia da FMRP-USP.

Obrigado aos colegas Rodrigo Panepucci e Amélia Góes de Araújo do laboratório de Hematologia de FMRP-USP pela possibilidade de execução de experimentos utilizando a técnica de *Real Time PCR*.

Agradeço ao Dr. Claudemir Melechco de Carvalho do Laboratório Fleury, pelo suporte técnico e científico nas dosagens de homocisteína. Ao Dr. Renato Haddad, agradeço pelas informações e conselhos para as mesmas dosagens.

Ao Dr. Luciano da Silva Paulino e ao Prof. Dr. Carlos Block Junior, ambos pertencente ao corpo de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA de Brasília, agradeço pela possibilidade de aprendizagem e execução de determinação protéica através de espectrometria de massa por MALDI.

Agradeço também ao Reinaldo, técnico do biotério da FCFRP, sempre bem humorado e disposto a ajudar.

Agradeço a equipe de vigilância da FCFRP que sempre colaborou comigo no entra e sai de laboratórios, principalmente fora do horário comercial. Obrigado também a todas as “faíscas” pela organização da minha bagunça e desculpem-me pelos momentos em que eu não as deixei trabalharem em paz.

Às fundações CAPES, CNPq e, principalmente à FAPESP, pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização deste trabalho.

Resumo

PAIVA, H.H. **Participação da galectina-1 na lesão vascular induzida em camundongos com hiperhomocisteinemia moderada.** 2007. 155p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

Galectina-1 (Gal-1) pertence à família de lectinas que reconhecem β -galactosídeos e pode ser expressa em vários tipos celulares, incluindo as células endoteliais e músculo liso. Esta lectina endógena possui propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias, dependentes de processos celulares, essenciais incluindo ativação, diferenciação, sobrevivência, fagocitose e adesão celular. Os eventos iniciais da lesão vascular são pouco conhecidos e, na literatura, são escassos os dados sobre a participação da Gal-1 nesses eventos. Portanto, neste trabalho, pretendeu-se avaliar a participação dessa lectina nos eventos iniciais da lesão vascular por hiperhomocisteinemia moderada induzida em camundongos. A dose padrão de 0,4g/Kg/dia de homocisteína-tiolactona foi administrada oralmente a camundongos selvagens (Gal-1^{+/+}) e destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1^{-/-}), por diferentes tempos, causando uma elevação da concentração plasmática de homocisteína total, Este fato provocou alterações na reatividade vascular de contração na artéria aorta e de rolamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas. Foi detectada a presença da Gal-1 nas aortas de animais Gal-1^{+/+} em todos tempos de tratamento e no controle, observando, porém, um aumento dela no grupo tratados por 15 dias e, mais expressa em 24 horas (expressão protéica por Western blot e imunofluorescência e, gênica por Real Time PCR). Neste tempo, houve maiores alterações metabólicas significativas como triglicérides, LDL, colesterol total, glicose e de homocisteína. A análise da expressão das óxido nítrico sintases revelou não haver alterações para NOS induzida (iNOS) entre os grupos de animais Gal-1^{+/+} controle e tratados, nem mesmo em relação aos animais controles Gal-1^{-/-}. Entretanto, o tratamento modulou a expressão da NOS endotelial (eNOS) nos animais Gal-1^{+/+}, havendo uma redução da proteína para os tempos de 48 horas e 7 dias (expressão protéica por imunohistoquímica -

peroxidase e, gênica por RT-PCR). O tratamento não alterou a concentração plasmática de óxido nítrico (NO) em camundongos Gal-1^{+/+}, mas foi detectada redução dos valores basais para animais Gal-1^{-/-} e, uma redução com o tratamento por 15 dias. Portanto, foi verificado que a expressão de Gal-1 foi aumentada com o tratamento de Hcy-T_{aq} nos tempos de 24 horas e 15 dias, onde se observam significativas e maiores alterações biológicas dos parâmetros de lesão vascular induzida pela hiperhomocisteinemia moderada analisadas: reatividade vascular, rolamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas, concentração de homocisteína plasmática, perfil lipídico e expressão da óxido nítrico sintase endotelial.

Palavras-chave: galectina-1, reconhecimento de carboidrato, β -galactosídeos, lesão vascular - aorta, homocisteína, hiperhomocisteinemia.

Abstract

PAIVA, H.H. **Engagement of galectin-1 in mild hyperhomocysteinemia-induced vascular injury in mice**. 2007. 155p. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

Galectin-1 (Gal-1) belongs to the lectin family of β -galactosides-binding proteins and can be expressed by several cell types, including endothelial cells and vascular smooth cells. This endogenous lectin has immunological and anti-inflammatory properties dependent of essential cellular processes, including activation, differentiation, survival, phagocytosis and cell adhesion. There are few and inconclusive studies about the engagement of Gal-1 in vascular injury initial processes. Thus, this work was conducted to evaluate the engagement of Gal-1 in hyperhomocysteinemia-induced vascular injury. Wild type (Gal-1^{+/+}) and Gal-1-knockout (Gal-1^{-/-}) mice were fed with 0,4g/Kg/day with thiolactone-homocysteine (D,L Hcy-T) for different times, provoking increased plasmatic total homocysteine levels. That has indicated alterations in aortic vasomotor responses and mesenteric venial leukocyte rolling and adhesion. Gal-1 was detected in aortic frozen section of Gal-1^{+/+} mice for all times of treatment with D,L Hcy-T, but more detected for aorta of 15 days treated animal group and, more expressed, for 24 hours ones (protein expression by Western blot and immunofluorescence and, genetic by Real Time PCR). Besides, at 24 hours of treatment, many metabolic alterations were observed: increased LDL, triglycerides, cholesterol, glucose and homocysteine levels. Expressions for nitric oxide sintases (NOS) showed no alteration for inducible NOS (iNOS) for Gal-1^{+/+} mice (treated or not), even for Gal-1^{-/-} untreat mice. However, the treatment was able to modulate endothelial NOS (eNOS) decreasing the expression at 48 hours and 7 days treated animals group (protein expression by imunoperoxidase and, genetic by RT-PCR). Gal-1^{-/-} mice have less circulating constitutive nitric oxide (NO) than Gal-1^{+/+} ones, and, the treatment has reduced these levels only for Gal-1^{-/-} 15 days treated mice but not for Gal-1^{+/+} ones . This work, therefore, has shown that Gal-1 is always expressed by aortas. However, increased expression of Gal-1 at 24 hours and 15 days of treatment has been often correlated to biological alterations in the in

hyperhomocysteinemia-induced vascular injury: aortic vasomotor responses, leukocyte rolling and adhesion in mesenteric venues, plasmatic homocysteine, lipid metabolites and NOS expression.

Key-words: galectin-1, carbohydrate recognition, β -galactosides, vascular injury, homocysteine, hyperhomocysteinemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura.01. Interações lectinas-carboidratos.	28
Figura.02. Representação esquemática dos membros da família das galectinas.	32
Figura.03. Diferenças estruturais entre os compostos do metabolismo da metionina: homocisteína e cisteína.	44
Figura.04. Ciclo metabólico da metionina.	44
Figura.05. quadro resumo das possíveis ações da homocisteína na lesão endotelial.	50
Figura.06. Perfil cromatográfico da purificação da Gal-1 a partir de extrato de <i>E. coli</i> .	85
Figura.07. Perfil do procedimento de re-cromatografia das preparações da galectina-1 recombinante humana em coluna de agarose-lactose.	85
Figura.08. Perfil da atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1.	86
Figura.09. Análise Eletroforética da IgG anti-Gal-1 purificada de soro de coelho imunizado com Gal-1.	88
Figura.10. Padronização de dose de HcyT _{aq} para protocolo de hiperhomocisteinemia moderada.	90
Figura.11. Determinação da concentração plasmática de homocisteína total em camundongos selvagens C57/BL6 submetidos, ou não, ao tratamento de hiperhomocisteinemia moderada na dose de 0,4g/Kg/dia de HcyT por diferentes tempos (12, 24 e 48 horas, 7 e 15 dias).	92
Figura.12. Análise microscópica da morfologia das artérias aortas de camundongos Gal-1 ^{+/+} tratados ou não com homocisteína-tiolactona.	94
Figura 13. Contagem de leucócitos em sangue periférico de camundongos Gal-1 ^{+/+} tratados ou não com homocisteína-tiolactona por 15 dias.	95
.14. Contagem total de plaquetas em sangue periférico de camundongos Gal-1 ^{+/+} tratados ou não com homocisteína-tiolactona por 15 dias.	95

Figura.15. Dosagens séricas do perfil lipídico e glicose de camundongos Gal-1 ^{+/+} tratados com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T _{aq} .	100
Figura.16. Detecção de Gal-1 em extrato de aortas de animais submetidos a HHcy moderada.	102
Figura.17. Detecção de Gal-1, por imunofluorescência, em artérias de camundongos selvagens, Gal-1 ^{+/+} , tratados ou não com homocisteína-tiolactona.	104
Figura.18. Expressão média do gene da Gal-1, por Real Time PCR, em aorta de animais tratados com 0,4g/Kg/dia de homocisteína-tiolactona.	107
Figura.19. Expressão de iNOS, por PCR em cDNA de artérias de camundongos selvagens (Gal-1 ^{+/+}) tratados ou não com Hcy-T _{aq} e animais destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1 ^{-/-}).	109
Figura.20. Expressão de eNOS, por PCR em cDNA de artérias de camundongos selvagens (Gal-1 ^{+/+}) tratados ou não com Hcy-T _{aq} e animais destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1 ^{-/-}).	109
Figura.21. Detecção da expressão das óxido nítrico sintetases endotelial (eNOS) e induzida (iNOS) em aortas de camundongos selvagens (Gal-1 ^{+/+}) tratados ou não com homocisteína-tiolactona e, de animais destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1 ^{-/-}) sem tratamento.	111
Figura.22. Concentração de NO ₃ em amostras de soro de camundongos selvagens e destituídos do gene da Gal-1, submetidos ou não ao tratamento de HHcy moderada por 15dias.	113
Figura.23. Análise da reatividade vascular para fenilefrina em aortas, desnudada de endotélio, extraídas de animais selvagens e destituídos do gene da Gal-1, em presença ou não de Gal-1 exógena.	116
Figura.24. Avaliação dos efeitos da fenilefrina na reatividade vascular de artérias, com e sem endotélio, de animais selvagens e destituídos do gene para Gal-1, tratados ou não com homocisteína-tiolactona.	119
Figura.25. Avaliação dos efeitos da acetilcolina na reatividade vascular de artérias com endotélio, de animais selvagens e destituídos do gene para Gal-1, tratados ou não com homocisteína-tiolactona..	120

Figura.26. Análise de rolamento e adesão de leucócitos na parede de vênulas mesentéricas de camundongos selvagens ($\text{Gal}^{+/+}$) e deficientes do gene para Gal-1 ($\text{Gal-1}^{-/-}$), tratados ou não como homocisteína-tiolactona.

123

Figura.27. Análise, por microscopia intravital, da adesão e transmigração leucocitárias em vênulas mesentéricas e regiões adjacentes de camundongos selvagens ($\text{Gal-1}^{+/+}$) com hiperhomocisteinemia moderada.

125

LISTA DE TABELAS

Tabela.01. Dosagens plasmáticas dos níveis de ácido úrico, creatinina e albumina em animais Gal-1 ^{+/+} tratados, ou não, para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.	96
Tabela.02. Dosagens plasmáticas das aminotransferases marcadoras de função hepática: ALT e AST em animais Gal-1 ^{+/+} tratados, ou não, para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.	97
Tabela.03. Dosagens plasmáticas glicose, LDL, HDL, triglicérides e colesterol total em animais Gal-1 ^{+/+} tratados, ou não, para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.	98
Tabela.04. Análise do nível de expressão gênica relativa da Gal-1 (em relação ao gene constitutivo GAPDH) em camundongos Gal-1 ^{+/+} controle e tratados por 15 dias para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.	106
Tabela.05. Concentração de NO ₃ em amostras de soro de camundongos selvagens submetidos ao tratamento de HHcy moderada em diferentes tempos de tratamento.	112

LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME – 2- β -Mercaptoetanol

Ach – Acetilcolina

ADMA – “*Asymmetric dimetilarginina*” – Dimetilarginina assimétrica

ALT – Alanina Amino Transferase

Ang II – Angiotensina II

AST – Aspartato Amino Transferase

BSA – “*Bovine Serum Albumine*” – Albumina de soro bovino

CAM – Carboxiamidometil

CRD – “*Carbohydrate Recognition Domain*” – Domínio de Reconhecimento de Carboidrato

CT – Cycle Therseshold

c β S – Cistationa beta sintetase

c β s – gene da Cistationa β -Sintetase

DO – Densidade Óptica.

DDAH – Dimetilarginina dimetilhidrolase

DEPC - Dietilpirocarbonato

DL Hcy – DL Homocisteína

DNA – “*Desoxirribonucleic Acid*” – Ácido Desoxirribonucléico

DNP – “*para-Nitrophenyl Phosphate, Dissodium*” – *p*-Nitrofenil fosfato de sódio

dsRNA – “*double strand RNA*” – RNA de fita dupla

DTT - 1,4-Dithiothreitol

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – “*Ethylene Diamine tetracetic acid*” - ácido etileno diaminotetracético

ELISA – “*Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay*” – Ensaio Imunoenzimático

Emáx - Efeito máximo desencadeado pelo agonista

eNOS – “*endotelial Nitric Oxide Sintase*” – Óxido Nítrico Sintase endotelial

FS – Fosfatidilserina

Gal – Galectina

GMP - Guanosina monofosfato

Gpx-1 – Glutathione peroxidase-1

Hcy – Homocisteína

Hcy-T – Homocisteína Tiolactona

Hcy-T_{aq} – solução aquosa de homocisteína tiolactona

HDL – “*High Density Lipoprotein*” – Lipoproteína de alta densidade

HHcy – Hiperhomocisteinemia

HPLC – “*High Performance Liquid Chromatograph*” Cromatografia líquida de alta resolução

HUVEC – “*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*” – Células Endoteliais de Veias de Cordão Umbilical Humano

IFN- γ – Interferon Gama

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IgG - Imunoglobulina G

Inos - “*inducible Nitric Oxide Sintase*” – Óxido Nítrico Sintase induzido

IPTG – isopropil β -D-tiogalacto piranozídeo.

KDa – kilo Dalton

LB – Meio de cultura: Lennox Broth

LC-MS/MS – Espectrofotômetro de Massa (dois) acoplado ao HPLC

LPS – Lipopolissacarídeos

Mthfr – gene da Metiltetrahidrofolato redutase

MTHFR – Metiltetrahidrofolato redutase

NADPH – Nicotinamida adenosina dinucleotídeo-P

NO – Óxido nítrico

NO_x - Mistura de íons plasmáticos NO₃⁻ e NO₂⁻

NOS – NO Sintase

NPS – Nitroprussiato de Sódio

PBS – Phosphate Buffer Saline

PCR – “*Polimerase Chain Reaction*” – Reação em Cadeia da Polimerase

pD₂ - [-log(EC₅₀)] indicador de potência do agonista

PDGF – “*Platelet-derived Growth Factor*” – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

pH – potencial Hidrogeniônico

Phe – Fenilefrina

RHD – “*Recombinat human Diameric*”

RNA – “*Ribonucleic Acid*” – Ácido Ribonucléico

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_t – RNA transportador

rpm - Rotações por minuto

SAM – S-adenosilmetonina

SDS – “*Sodium Dodecyl Sulfate*” Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – “*SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis*” - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

TGF- β – “*Transforming Growth Factor – beta*” Fator de Crescimento Transformante – beta

TGO – Transaminase Glutâmica Oxalacética

TGP – Transaminase Glutâmica Pirúvica

Th-2 – Resposta Imunológica mediada por Linfócitos T *helper* – 2

TNF- β – “*Tumor Necrosis Factor – beta*” - Fator de Necrose Tumoral

TUNEL – “*Terminal Transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling*”

xg – vezes a força gravitacional

SUMÁRIO

1. Introdução	25
1.1) Galectina-1 é uma lectina multifuncional de mamífero que reconhece β -galactosídeos	26
1.1.1) Lectinas: uma abordagem histórica e aspectos gerais	26
1.1.2) Galectinas	30
1.1.3) Galectina-1 e a modulação da resposta inflamatória	33
1.2. Galectinas e o impacto sobre células endoteliais e musculares vasculares	38
1.3) Homocisteína, um causador de lesão endotelial, em modelo de Hiperhomocisteinemia moderada em camundongos	43
2. Objetivos	51
2.1) Geral	52
2.2) Específicos.	52
3. Material e Métodos	53
3.1) Obtenção da galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1)	54
3.1.1) Obtenção do extrato bruto bacteriano	54
3.1.2) Purificação da Gal-1	55
3.2) Controle da atividade lectínica por hemaglutinação	58
3.3) Produção de Imunoglobulina de coelho policlonal anti-Gal-1 humana	59

3.3.1) Imunização de animal e obtenção de soro	59
3.3.2) Purificação das imunoglobulinas anti-Gal-1 do soro de coelho	60
3.4) Animais	60
3.5) Implementação de modelo de hiperhomocisteinemia moderada em camundongos	61
3.5.1) Padronização do modelo	61
3.5.2 Protocolo de hiperhomocisteinemia	62
3.6) Dosagem de homocisteína plasmática total	63
3.7) Análise da reatividade vascular de aortas	64
3.8) Análise de disfunção vascular por microscopia intravital	66
3.9) Determinação bioquímica de metabólitos plasmáticos	67
3.10) Determinação da concentração de nitrato em soro sangüíneo	68
3.11) Contagem de células sanguíneas	69
3.12) Preparo de lâminas histológicas de cortes de artérias aorta	70
3.12.1) Histologia das artérias aorta	71
3.12.2) Imunohistoquímica – Peroxidase	71
3.12.3) Imunofluorescência	73
3.13) SDS-PAGE e Western Blotting	74

3.14) Análise de expressão gênica por Real Time PCR	76
3.14.1) Extração de RNA total	76
3.14.2) Amplificação de DNA por Real Time PCR	77
3.15) Reação em cadeia da polimerase do transcrito reversamente (RT-PCR)	80
3.16) Análise Estatística	81
4. Resultados e Discussão	80
4.1) Obtenção de galectina-1 recombinante humana	81
4.2) Análise da atividade hemaglutinante da Gal-1	86
4.3) Produção de imunoglobulina policlonal de coelho anti-Gal-1	87
4.4) Padronização do modelo de hiperhomocisteinemia moderada em camundongos	88
4.5) Histologia das Artérias Aorta	93
4.6) Contagem de células sanguíneas	94
4.7) Análise sérica de metabólitos bioquímicos	96
4.8) Imunodeteção de Gal-1 em aortas, por técnica de western blot	101
4.9) Imunodeteção de Gal-1 em aortas, por fluorescência	102
4.10) Quantificação de RNA mensageiro em aortas	105
4.11) RT-PCR	108
4.12) Detecção de eNOS e iNOS, por imunohistoquímica - peroxidase	110

4.13) Determinação da concentração de nitrato em soro sangüíneo	112
4.14) Estudo de funcionalidade vascular: reatividade	114
4.15) Microscopia intravital	122
5. Conclusão	127
6. Referências	130

1. Introdução

1.1) *Galectina-1 é uma lectina multifuncional de mamífero que reconhece β -galactosídeos*

1.1.1) *Lectinas: uma abordagem histórica e aspectos gerais*

Lectinas são proteínas capazes de reconhecer carboidratos de modo específico: associados (glicoconjugados), ou não, a outras moléculas como proteínas e lipídeos (LIS; SHARON, 1986; SHARON; LIS, 1998; VARKI *et al.*, 1999). Originalmente, as lectinas foram identificadas em plantas como proteínas que apresentavam a habilidade de aglutinar eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos de modo seletivo (revisado por SHARON; LIS, 1972). Boyd e Shapleigh (1954) consideraram a atividade hemaglutinante dessas proteínas para cunharem o nome lectina, do latim *legere*, escolher, reconhecer ou discriminar. Sharon e Lis (1972) propuseram a generalização do termo lectina para toda proteína com capacidade de reconhecer açúcar de modo específico de origem não imune.

As lectinas estão presentes em vários organismos, desde vírus a seres humanos (SHARON; LIS, 1989; KARLSSON, 1995; SHARON; LIS, 1998). Provavelmente, o primeiro registro da literatura sobre a presença de atividade lectínica em animais foi feito por Flexner e Noguchi (1902). Eles demonstraram que o veneno de serpente *Crotalus durissus* era capaz de promover a aglutinação de eritrócitos humanos (citado em KILPATRICK, 2002).

A primeira evidência direta da existência de lectinas em mamíferos foi obtida a partir de estudos que demonstraram que a meia-vida de glicoproteínas séricas poderia ser controlada por atividade lectínica presente no fígado de coelhos (ASHWELL; MORELL, 1972). A continuação do trabalho destes pesquisadores levou ao isolamento pioneiro de uma lectina de mamífero, ela foi purificada do fígado de coelhos, ligava-se a resíduos de galactose e foi denominada receptor hepático para asialoglicoproteínas (STOCKERT *et al.*, 1974; HUDGIN *et al.*, 1974).

A partir de meados de 70, vários achados sobre lectinas de origem animal e ligantes β -galactosídeos foram descritos. Barondes *et al.* (1994), propuseram a criação da família das galectinas para agrupar essas proteínas. A “eletrolectin” foi o primeiro membro dessa família, ela foi isolada a partir de tecidos de peixe elétrico (TEICHBERG *et al.*, 1975). Ainda nessa época, foram descritas as primeiras lectinas ligantes de β -galactosídeos derivadas de mamíferos (de WAARD *et al.*, 1976), as quais foram posteriormente definidas com galectina-1 e 3 (BARONDES *et al.*, 1994a e b).

Há uma enorme diversidade estrutural de glicoconjugados nos seres vivos, a qual pode estar associada a uma grande diversidade biológica, pois estas glico-estruturas podem codificar diversas informações biológicas que podem ser decodificadas por lectinas (SHARON; LIS, 1989; SHARON; LIS, 1998; vide figura.01).

Figura.01. Interações lectinas-carboidratos. Lectinas mediam interações célula-célula e/ou célula-matriz extracelular através do reconhecimento específico de glicoconjugados. A interação lectina-carboidrato pode promover a ligação de moléculas bioativas em componentes celulares. As lectinas podem participar de vários eventos biológicos como: infecção microbiana; defesa de plantas; síntese de glicoproteínas; imunidade inata e resposta inflamatória; ativação, proliferação e crescimento celulares; apoptose; embriogênese e fertilização.

Portanto, o reconhecimento de carboidratos por lectinas é um fenômeno bioquímico associado a vários processos fisiológicos e/ou patológicos como fertilização, embriogênese, migração, proliferação e diferenciação celulares, defesa imunológica, infecção por microorganismos e, câncer (LIS; SHARON, 1986; LIS; SHARON, 1989; LIS; SHARON, 1998; SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LIU; RABINOVICH, 2005). Além disso,

lectinas podem ser utilizadas como ferramentas na pesquisa básica e aplicada (SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; SANTUCCI *et al.*, 2003; ROGÉRIO *et al.*, 2007, SHARON, 2007).

Nas superfícies das células de vertebrados existe uma camada de glicoconjugados composta por glicoproteínas, glicolipídios e glicosaminoglicanos, conhecida por “glycocalix” que pode ser alvo para diferentes lectinas (VARKI *et al.*, 1999). Geralmente, as lectinas são moléculas multivalentes que podem estabelecer pontes entre células e matriz extracelular, através do reconhecimento concomitante de glicanas contidas em ambas as estruturas (LIS; SHARON, 1993).

Em linhas gerais, o reconhecimento de carboidratos pelas lectinas é um evento reversível que se manifesta por meio de um equilíbrio químico regido pela lei da ação das massas. Assim, a afinidade química de uma lectina por seu ligante pode ser definida a partir da constante desse equilíbrio (VARKI *et al.*, 1999). As ligações químicas mais comuns envolvidas na combinação entre lectinas e glicanas são pontes de hidrogênio (sendo às vezes mediadas pela água), ligações hidrofóbicas, interações eletrostáticas (menos freqüentes) e coordenação por metais (revisto por, SHARON, 2007).

A capacidade das lectinas de se ligar especificamente a açúcares é atribuível a uma porção globular e limitada dessas moléculas, denominada domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (WEIS; DRICKAMER, 1996, DOBB; DRICKAMER, 2001). Os CRDs de muitas lectinas relacionam-se entre si, quanto à seqüência de aminoácidos e a especificidade de carboidratos, o que

faz com que muitas lectinas conhecidas possam ser agrupadas em famílias (WEIS; DRICKAMER, 1996; DOBB; DRICKAMER, 2001). Uma das famílias de lectinas animais mais estudada é a das galectinas, sendo que, inicialmente, os membros dessa família foram caracterizados como lectinas tipo-S ou Lac-S por reconhecerem β -galactosídeos de modo dependente de estado de oxidação de seus grupos sulfidrílicos presentes em cisteínas livres e independente de íons cálcio (BARONDES *et al.*, 1994a e b; COOPER; BARONDES, 1999). Na atualidade, sabe-se que a propriedade lectínica das galectinas não é, necessariamente, dependente de grupos sulfidrílicos (KILPATRICK, 2002).

1.1.2) Galectinas

As galectinas são lectinas de mamíferos que apresentam seqüências de consenso de aminoácidos no CRD e reconhecem preferencialmente unidades repetidas de lactosaminas, polilactosaminas, com resíduos de galactose acessíveis (BARONDES *et al.*, 1994a e b; STOWELL *et al.*, 2004; LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004). A importância biológica das galectinas pode ser ilustrada pela elevada conservação evolucionária e pela ampla distribuição dessas proteínas, pois distintos tecidos e/ou células de diferentes organismos (protozoários a seres humanos) podem expressar essas lectinas ou seus homólogos (RUBINSTEIN *et al.*, 2004b). Estudos termodinâmicos e biológicos mostram que apesar dessas proteínas reconhecerem lactosaminas como

requisito químico mínimo, elas podem apresentar diferenças sutis de especificidade no reconhecimento de carboidratos. Por exemplo, a galectina-1, e não a galectina-3, liga-se com maior afinidade para resíduos de galactose terminais do que os internos em polilactosaminas (AHMAD *et al.*, 2004., STOWELL *et al.*, 2004). Nessa linha, tem sido descrito que as galectinas 1 e 3 podem reconhecer distintas glicanas na superfície de células T e isto pode influenciar diferencialmente a produção de citocinas e a apoptose dessas células (STILLMAN *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2007; van der Leij *et al.*, 2007).

Atualmente já foram descritas 15 galectinas derivadas de mamíferos e todas apresentam um CRD com aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos. Hirabayashi e Kasai (1993) classificaram as galectinas em 3 categorias: “proto-type”, químera e “tandem repeat-type”. As primeiras possuem um único tipo de CRD e se apresentam com monômeros ou dímeros com CRD idênticos associados de modo não-covalente (galectinas: 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15). A galectina-3 representa o tipo químera, ela tem um CRD e um domínio não-lectínico envolvido em sua oligomerização. As galectinas 4, 6, 8, 9 e 12 são conhecidas como “Tandem repeat-type” por apresentarem dois CDRs distintos unidos por pequeno peptídeo ligador (RUBINSTEIN *et al.*, 2004b ; LIU *et al.*, 2005, vide figura.02).

Figura.02. Representação esquemática dos membros da família das galectinas. Adaptado de RUBINSTEIN *et al.*, 2004b.

A maioria das galectinas apresenta características de proteínas citoplasmáticas como região N-terminal acetilada, presença de grupos sulfidrílicos não-oxidados (livres) e ausência de glicosilação (RUBINSTEIN *et al.*, 2004b). Entretanto, as galectinas podem estar localizadas na superfície celular, matriz extracelular, citoplasma e núcleo (RUBINSTEIN *et al.*, 2004b). Apesar dessas proteínas serem detectadas no meio extracelular, elas não apresentam peptídeo sinal, sendo secretadas pelas células por mecanismo não clássico e independente do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (HUGHES, 1999). Dados da literatura sugerem que a galectina-1 (Gal-1) pode ser secretada pela translocação direta do citosol através da membrana plasmática com auxílio de fatores do citosol e da membrana, como descrito para o fator-2 de crescimento de fibroblasto (SCHÄFER *et al.*, 2004; NICKEL *et al.*, 2005). Como as galectinas são bivalentes, elas podem promover no meio extracelular o

intercruzamento de glicoconjugados da superfície das células e induzir eventos de transdução de sinal por meio da formação de agrupamentos de receptores e de uma malha (galectina-receptor) na superfície celular (BREWER, *et al.*, 2002). Já no meio intracelular, os eventos biológicos das galectinas parecem não-depender de sua propriedade lectínica e nesse microambiente elas podem participar do processamento de RNA e da regulação da homeostasia celular (LIU *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004). Interessantemente, as galectinas podem exercer efeitos antagônicos em função da localização destas proteínas no meio intra ou extracelular (YANG *et al.*, 1996; FUKUMORI *et al.*, 2003).

As galectinas são moléculas multifuncionais que participam de vários processos biológicos como controle da adesão, proliferação e ciclo celulares, apoptose, gênese de tumores, fagocitose e processamento de RNA (PERILLO *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2002; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LEFFLER *et al.*, 2004; RUBINSTEIN *et al.*, 2004a, STOWELL *et al.*, 2007). As galectinas também podem estar associadas ao risco de infarto do miocárdio e ao controle de processo inflamatório (TANAKA; OZAKI, 2006; OZAKI *et al.*, 2004; TOSCANO *et al.*, 2006).

1.1.3) Galectina-1 e a modulação da resposta inflamatória

A Gal-1 foi o primeiro membro dessa família de lectinas de mamíferos e uma das mais estudadas. O gene da galectina-1 em humanos está localizado no

cromossomo 22 entre as regiões q12-q13 e em camundongos na região E do cromossomo 15 (GITT; BARONDES, 1991; BALDINI *et al.*, 1993). Esta lectina é um homodímero de 28000 Da, associado de modo não covalente apresentando uma constante de dissociação de $\sim 7\mu\text{M}$ (CHO; CUMMINGS, 1995). A expressão da Gal-1 é verificada em vários tecidos. Em condições normais, a Gal-1 está expressa em músculos, timo, próstata, fígado, baço, células endoteliais, pele e cérebro em desenvolvimento (YANG; LIU, 2003). Já em condições patológicas, a Gal-1 é expressa em carcinomas de tiróide, cólon, ovário, melanoma e linfoma (PERILLO *et al.*, 1998). Vários agentes podem induzir a expressão de galectina-1 como, por exemplo, o estrógeno (TAHARA *et al.*, 2003), lipoproteína de baixo peso molecular minimamente oxidada e citocinas (BAUM *et al.*, 1995). Já outros compostos como benzodiazepínicos (ROCHARD *et al.*, 2004) e ácido retinóico (LU *et al.*, 2000) podem inibir a expressão dessa lectina. Na literatura, não há dados sobre a interferência da homocisteína na expressão de galectinas.

Já foram descritos vários ligantes para a Gal-1 incluindo os localizados na superfície celular, com as integrinas; nos lisossomos, com as proteínas de membrana lisossomal 1 e 2; no citoplasma, com o oncogene H-Ras; no núcleo, com ribonucleoproteínas e Gemin-4; e na matriz extracelular, com laminina e fibronectina (CAMBY *et al.*, 2006).

A maioria dos efeitos biológicos da Gal-1 são dependentes de sua propriedade lectínica e a oxidação dos grupos sulfidrílicos de suas cisteínas impede o reconhecimento de carboidratos por esta lectina (VARKI *et al.*, 1999). O meio intracelular apresenta caráter redutor enquanto o extracelular é oxidante.

Portanto, segundo alguns autores, a preservação da atividade lectínica da Gal-1 no meio extracelular ou em condições experimentais *in vitro* é dependente da ligação imediata dessa proteína aos seus ligantes e/ou da presença de agentes redutores com 2-ME (BAUM *et al.*, 1995, VARKI *et al.*, 1999; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003, STOWELL, *et al.*, 2007). Entretanto, a Gal-1 oxidada, forma sem atividade lectínica, é capaz de promover crescimento axonal de neurônios da raiz dorsal após a instalação de lesão de nervos periféricos (KADOYA *et al.*, 2005).

Tem sido descrito que a Gal-1 pode modular negativamente a resposta inflamatória, pois essa lectina é capaz de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células T (RABINOVICH *et al.*, 1999). Nessa linha, foi descrito que o efeito antiinflamatório da Gal-1 também pode ser exercido através da inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, tais como IL-2, Interferon γ (INF- γ) e TNF- α (ILARREGUI *et al.*, 2005). Estudos *in vivo* em modelos experimentais de inflamação crônica e autoimunidade mostraram a capacidade da Gal-1 de modular o balanço da resposta inflamatória em direção a resposta Th-2, com diminuição dos níveis de IFN- γ e aumento dos níveis de secreção de IL-5 ou IL-10 por estas células (SANTUCCI *et al.*, 2003; BAUM *et al.*, 2003).

Dados da literatura demonstram que Gal-1 induz apoptose em timócitos periféricos e em desenvolvimento (PERILLO *et al.*, 1995; RABINOVICH *et al.*, 1997; RABINOVICH *et al.*, 1998). Foi demonstrado que a Gal-1 induz apoptose dos timócitos corticais *in vitro*, sugerindo que a Gal-1 tem um papel na

manutenção da tolerância central (PERILLO *et al.*, 1997). A presença de Gal-1 em células T ativadas, mas não em células T em repouso, sugere um mecanismo autócrino de suicídio para manutenção da homeostasia durante o término da resposta imune (BLASSER *et al.*, 1998).

Em relação ao potencial pró-apoptótico da Gal-1, existem relatos contraditórios na literatura. Células T linfoblastóides da linhagem CEM quando tratadas com Gal-1 não apresentaram marcação com 7-aminoactinomicina D, um conhecido indicador de apoptose (PERILLO *et al.*, 1995). Em outros estudos, demonstrou-se que Gal-1 induz apoptose em células CEM e em células de linhagem T MOLT-4, indicada pela monitorização da exposição de fosfatidilserina (FS) (PACE *et al.*, 1999; PACE *et al.*, 2000), um fosfolípido de membrana que pode ser expresso na superfície de células apoptóticas (MARTIN *et al.*, 1995) e não-apoptóticas (FRASCH *et al.*, 2000). Ao contrário, mostrou-se que apesar da Gal-1 induzir a exposição de FS na superfície de células MOLT-4, estas não entram em apoptose, pois não se detectou fragmentação de DNA e perda da capacidade proliferativa nessas células após tratamento com Gal-1 (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2001; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2007). Além disso, Gal-1 dimérica promove a exposição de FS na superfície de neutrófilos pré-ativados e a fagocitose dessas células e das células MOLT-4. Assim, estes autores sugerem que a fagocitose de leucócitos, na ausência de apoptose, é uma das vias pela qual a Gal-1 pode modular a homeostasia leucocitária e a resolução da inflamação. Nessa linha, Chung *et al.* (2000) demonstraram que a Gal-1 pode promover a fosforilação parcial da cadeia zeta

do receptor de células T e este fato pode inibir os eventos iniciais da ativação dessas células sem promover apoptose. Recentemente, foi descrito que a Gal-1 pode ser uma importante molécula efetora do controle de processos autoimunes por ativar células T CD4+CD25+ (células T regulatórias) e mediar produção de IL-10 e TGF- β (GARIN *et al.*, 2007). Entretanto, a Gal-1 pode promover a apoptose de células T produtoras de citocina pró-inflamatória IL-17 (Th-17) e não de células TH2 produtoras de IL-10 e TGF- β (citocinas com caráter anti-inflamatório) por meio de reconhecimento diferencial de glicanas na superfícies dessas células (TOSCANO *et al.*, 2007). Segundo alguns autores, a participação da apoptose nos eventos de induzidos pela Gal-1, relacionados ao controle da resposta imunológica adaptativa e da inflamação, pode ocorrer em função do tipo celular, do microambiente e do padrão de glicosilação das células alvo (BIANCO, *et al.*, 2006).

Interessantemente, 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). A Gal-1 pode também bloquear eventos da resposta inflamatória aguda, pois ela foi capaz de inibir o edema e o extravasamento de neutrófilos em resposta ao desafio *in vivo* com fosfolipase A2 (RABINOVICH *et al.*, 2000). Além disso, estes autores mostraram que Gal-1, *in vitro*, é capaz de inibir a liberação do ácido aracdônico e a produção de prostaglandina E2 por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS. Nessa linha, Gil *et al.* (2006a), reportaram que a injeção

intravenosa de Gal-1 inibe o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos desafiados com carragenina (GIL *et al.*, 2006b). Além disso, segundo alguns pesquisadores o efeito antiinflamatório de glicocorticóides em pacientes com pólipos nasais pode estar parcialmente relacionado ao aumento da expressão de anexina-1 e Gal-1 no epitélio nasal destes pacientes (SENA *et al.*, 2006).

1.2) *Galectinas e o impacto sobre células endoteliais e musculares vasculares*

O endotélio vascular é uma monocamada de células pavimentosas, alongadas, que recobre a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. As células endoteliais formam a luz dos vasos e estão assentadas na zona subendotelial, formada pela matriz extracelular, que se estende até a lâmina elástica interna. A lâmina elástica interna separa a camada íntima (camada endotelial e a camada subendotelial) da média (camada muscular lisa) (HENNIG *et al.*, 1994).

O endotélio é atualmente reconhecido não somente como barreira física entre o sangue e a parede vascular, mas também como órgão estrategicamente localizado com múltiplas funções, sendo elas autócrinas, parácrinas e endócrinas. Atua na regulação do tônus vascular, na aderência de monócitos, na

trombogênese, na inflamação, no metabolismo lipídico e na remodelação do crescimento dos vasos. (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004).

O endotélio forma uma barreira seletiva regulando o fluxo de nutrientes, de biomoléculas e de células sangüíneas. Mantém o balanço entre a fibrinólise e trombose promovendo uma superfície não trombótica devido à sua capacidade de produção de derivados de prostaciclina, principalmente prostaglandinas, potente vasodilatador e forte inibidor da agregação plaquetária. Além de secretar substâncias, incluindo plasminogênio, capazes de lisar coágulos. Entretanto, as células endoteliais sintetizam fatores pró-coagulantes como fator de Von Willebrand (vWF) além de substâncias trombogênicas, como fatores de coagulação, moléculas de adesão, inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1) e tromboxano A2 (PEARSON, 1999).

O tecido endotelial é capaz de inibir a proliferação do músculo liso vascular, prevenindo a migração das células da musculatura vascular lisa através de mecanismos diretos, como a síntese de óxido nítrico. Além disso, desempenha papel crucial na homeostasia vascular e na prevenção do início e progresso da doença cardiovascular, através da síntese de fatores que atuam nas células da musculatura lisa (MAHMOUDI *et al.*, 2007). Atuando na modulação do tônus vascular através do balanço na liberação de substâncias vasoativas. Entre estas os fatores que promovem vasodilatação, os chamados fatores de dilatação derivados do endotélio -*Endothelium-derived vasodilator factors- EDVF*: Óxido Nítrico (*Nitric Oxide- NO*), Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (*Endothelium-derived hyperpolarizing factor -EDHF*), prostaciclina

(*Prostacyclin* I_2 - PGI_2), acetilcolina e bradicinina. E os que promovem vasoconstrição: endotelina (*Endothelin* - 1 – ET-1), prostanóides (prostaglandina H_2 – PGH_2 , tromboxano A_2 – TXA_2 e angiotensina). O NO é o principal mediador do tônus vascular (STANKEVICIUS *et al.*, 2003).

Gal-1 é expressa em células endoteliais de diferentes origens incluindo de pulmão, fígado e cérebro murinos e aorta humana e bovina (CAMBY *et al.*, 2006). A ativação de células endoteliais, *in vitro* e *in vivo*, promove um aumento da expressão dessa lectina e isto pode ser considerado um marcador de ativação *in vitro* de células endoteliais da veia umbilical humana (BAUM *et al.*, 1995; THIJSEN *et al.*, 2006).

Gal-1 é capaz de induzir a proliferação de células da musculatura lisa vascular e seu possível papel nos eventos de lesão de vasos sanguíneos (MOISEEVA *et al.*, 2000). Salienta-se, que o processo de injúria vascular é um evento multi-mediado e importante na fisiopatologia deste tecido e que as fases iniciais desse processo são pouco conhecidas.

Algumas citocinas e proteínas ligadoras de carboidrato, como E-selectina, P-selectina, podem promover a migração e morfogênese de células endoteliais por reconhecerem seus respectivos glico-conjugados nas superfícies dessas células (MEININGER *et al.*, 1992; NGUYEN *et al.*, 1996, KOCH *et al.*, 1995, MORBIDELLI *et al.*, 1998).

No processo inflamatório e nos eventos da resposta imunológica específica, a migração de leucócitos circulantes pelo endotélio é um passo importante para resposta imunológica a agentes agressores e/ou contra a

progressão tumoral (LASKY *et al.*, 1992). Nesse evento, o reconhecimento de carboidratos por selectinas é crucial. Gal-1 possui atividades antiinflamatórias e sua expressão pode ser aumentada por mediadores pró-inflamatórios, como lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (BAUM *et al.*, 1995; LOTAN *et al.*, 1994). Interessantemente, essa lectina foi descrita como um inibidor dos passos iniciais da interação do endotélio com neutrófilos (LA *et al.*, 2003) ou com linfócitos T (HE; BAUM, 2006). Um outro membro da família das galectinas, a Gal-3, é capaz de reconhecer glicanas na superfície endotelial e disparar a cascata de sinalização relacionada à diferenciação e angiogênese de células endoteliais (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2000; RABINOVICH *et al.*, 2006).

Gal-1 e Gal-3 podem apresentar funções antagônicas em algumas situações, como por exemplo, a primeira pode apresentar efeito anti-inflamatório e apoptótico enquanto a Gal-3 não (RUBINSTEIN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005). Nessa linha, tem sido demonstrado que Gal-3 participa da transdiferenciação de células do músculo liso vascular de aorta murina para células de gordura macrófagos-*símile* (RONG *et al.*, 2003) ou pode promover a proliferação dessas células musculares favorecendo a instalação da aterosclerose (SEKI *et al.*, 2003). Entretanto, a Gal-1 pode provocar a transdiferenciação de fibroblasto para células musculares e/ou promover o crescimento de miotubos no processo de regeneração muscular (GOLDRING *et al.*, 2002; KAMI *et al.*, 2005).

Foi demonstrada que as células musculares de vasos sanguíneos podem expressar maior quantidade de Gal-1 após a desnudação endotelial provocada pela injúria vascular em artérias coronária humanas (MOISEEVA *et al.*, 2000).

Esses pesquisadores demonstraram que TGF-beta, PDGF e Ang II poderiam cooperar para o aumento da expressão da Gal-1 nas artérias coronárias lesionadas (MOISEEVA *et al.*, 2000). Interessantemente, a homocisteína pode aumentar a expressão de TGF-beta e TNF-alfa (MIDORIKAWA *et al.*, 2000) e o TGF-beta pode provocar um quadro de homocisteinemia em pacientes transplantados (SENGOELGE *et al.*, 2003). Segundo alguns autores a Gal-1 pode participar do evento da injúria vascular por controlar a remodelação de componentes da matriz extracelular (MOISEEVA *et al.*, 2003b) e por interagir com células musculares do vaso via beta-1 integrina (MOISEEVA *et al.*, 2003a). Segundo esses autores, o entendimento da participação da Gal-1 no processo de injúria vascular pode contribuir com o desenvolvimento de propostas terapêuticas relacionadas a este fenômeno. Interessantemente, vem sendo sugerida a aplicação terapêutica da galectina-1 para doenças inflamatórias e degenerativas neuromusculares (KAMI *et al.*, 2005; KATO *et al.* 2005 e TOSCANO *et al.* 2006).

O acúmulo de lipoproteína A nas paredes dos vasos sanguíneos está intimamente envolvido com o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (MURAI *et al.*, 1986; CRAIG *et al.*, 1988; DANGAS *et al.*, 1998). Dados da literatura mostram que Gal-1 humana liga-se a lipoproteína A, via reconhecimento de carboidratos, e isto pode mediar o acúmulo de lipoproteína A nas paredes de vasos arteriais em humanos (CHELLAN *et al.*, 2007).

1.3) Homocisteína, um causador de lesão endotelial, em modelo de Hiperhomocisteinemia moderada em camundongos

As doenças cardiovasculares são as principais causas de mortes nos Estados Unidos, Europa e grande parte da Ásia (ROSS, 1999). Essa realidade atinge também países em desenvolvimento como o Brasil, a Venezuela e a Colômbia, onde as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 20 a 35% do total de óbitos (HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 1998). Diferentes fatores de risco estão relacionados ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares, dentre eles, tem sido observado que níveis plasmáticos elevados de homocisteína são um indicador do desenvolvimento de processos de lesão vascular (OLDENBURG *et al.*, 2000).

A homocisteína é um aminoácido sulfurado, intermediário do metabolismo da metionina (figura.03 e figura.04), produzido por reações de transferência de grupo metil, importantes na síntese de DNA, proteínas metiladas, neurotransmissores e fosfolípidios. (SELHUB, 1999). A hipótese que a homocisteína causa doenças vasculares foi proposta por McCully em 1969, com base em descrições de lesões arteriais avançadas em crianças nascidas com erro inato de metabolismo de metionina. No passar das últimas décadas, fortes evidências têm corroborado com a teoria do poder lesivo da homocisteína no desenvolvimento de aterosclerose e trombose, nos vasos sanguíneos centrais e periféricos, por induzir lesão no endotélio vascular e conseqüente proliferação

das células da musculatura lisa dos vasos (STAMPFER *et al.*, 1995; den HEIJER *et al.*, 1998; HANKEY, 2002).

A concentração plasmática de homocisteína, em humanos, está entre 5 a 15 μM em indivíduos saudáveis e em jejum (STILL; McDOWELL, 1998). O aumento desses valores é classificado como hiperhomocisteinemia moderada (16-30 μM), intermediária (31-100 μM) e severa (acima dos 100 μM) (KANG *et al.*, 1992).

O desenvolvimento da hiperhomocisteinemia também pode ter causas no erro inato do metabolismo da metionina, que consiste das alterações genéticas das enzimas cistationina β -sintetase (C β S) ou metiltetrahidrofolato redutase (MTHFR) (BOERS *et al.*, 1985; GOYETTE *et al.*, 1995). Pacientes com o quadro de hiperhomocisteinemia severa, quando não tratados, têm 50% de chances de desenvolverem doenças associadas à lesão endotelial (infarto do miocárdio, paradas cardíacas, derrame cerebral e trombo-embolismo venoso) antes dos 30 anos (MUDD *et al.*, 1985; den HEIJER *et al.*, 2005).

Ao contrário da hiperhomocisteinemia severa, que é principalmente encontrada em causas de desordens genéticas, a moderada e intermediária são bastante prevalentes, podendo apresentar como causa, as insuficiências nutricionais, como deficiência de consumo direto ou indireto de folato, cobalamina (vitamina B12) e vitamina B6 (STAMPFER *et al.*, 1995), o que pode ser controlada pela ingestão de frutas frescas e suplementos vitamínicos (UBBINK, 1996). Alguns medicamentos, como niacina, fibratos, metotrexato, isoniazida, L-dopa, teofilina, fenitoína, óxido nítrico e trimetoprima também podem elevar níveis plasmáticos de homocisteína, além dos conhecidos polimorfismos nos genes da metiltetrahidrofolato redutase (MTHFR) e doença renal (LENTZ *et al.*, 2004). A hiperhomocisteinemia é encontrada ainda em pacientes de dieta aumentada de metionina (GUTTORMSEN *et al.*, 1994), vida sedentária (NYGARD *et al.*, 1995), menopausa (MIJATOVIC; van der MOOREN, 2000), envelhecimento (JACQUES *et al.*, 1999), alcoolismo (de BREE *et al.*, 2001), entre outros.

Para melhor estudar a participação da homocisteína nos eventos da injúria vascular e posterior desenvolvimento de doenças cardiovasculares, muitos modelos de experimentação de hiperhomocisteinemia têm sido empregados, como porcos (ROLLAND *et al.*, 1995), babuínos (HARKER *et al.*, 1974, 1976, 1983), macacos (LENTZ *et al.*, 1996) assim como coelhos, ratos e camundongos. Este último modelo tem sido o mais utilizado, pela grande disponibilidade de animais deficientes de um dos genes envolvidos no

metabolismo da homocisteína: *Mthfr* (CHEN *et al.*, 2001) *Mtr* (SWANSON *et al.*, 2001) e *Cbs* (WATANABE, 1995).

Os mecanismos, pelos quais a homocisteína promove lesão endotelial e proliferação de musculatura lisa, ainda não estão bem estabelecidos e são várias as proposições sobre esse respeito.

A homocisteína contém um grupo reativo tiol que pode ser alvo de reações de trocas de dissulfetos com proteínas contendo resíduos de cisteína, potencialmente alterando as funções de proteínas críticas para a manutenção da homeostase vascular (SENGUPTA *et al.*, 2001). Proteínas ligadas a homocisteína (reação de S-tiol) têm sido detectadas em plasma sanguíneo por diversos estudos, e incluem albumina (SENGUPTA *et al.*, 2001), fibronectina (MAJORS *et al.*, 2002) transtirretina (SASS *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2003) e fator V (UNDAS *et al.*, 2001), assim como receptores protéicos de superfície celular Anexina II (HAJJAR *et al.*, 1998) e a proteína intracelular dimetilarginina dimetilaminohidrolase, DDAH (STHULINGER *et al.*, 2003).

A homocisteína também pode induzir modificações em proteínas através de um mecanismo mediado por uma forma tio-éster cíclica da homocisteína, a homocisteína-tiolactona. Esta, é formada pela atividade da enzima RNAt-sintetase, numa reação de erro de edição, quando a homocisteína é incorporada erradamente à enzima no lugar da metionina (JAKUBOWSKI *et al.*, 2000). Desta forma, a homocisteína-tiolactona é um intermediário reativo que pode causar N-acetilação de proteínas através da formação de ligações de amida com grupos ξ -amino de proteínas (JAKUBOWSKI *et al.*, 2000). Algumas proteínas N ξ -

homocisteinilizadas incluem albumina e hemoglobina (JAKUBOWSKI *et al.*, 2002).

Modificações protéicas induzidas pelo aumento plasmático de homocisteína podem influenciar o bom funcionamento celular pelo comprometimento do retículo endoplasmático, devido a presença de trocas de dissulfetos de homocisteína com proteínas, o que gera uma conformação terciária protéica diferente da original, com funções básicas diminuídas ou inativas. Essas observações foram feitas por Lenz *et al.* (1993,1991) em trobomodulina e fator de von Villebrand. Essa condição é conhecida como estresse do retículo endoplasmático, incluindo desregulação de metabolismo de lipídeos, ativação de resposta inflamatória e prejuízo na sinalização de insulina (AUSTIN *et al.*, 2004). O estresse prolongado ou severo pode levar a morte celular programada – apoptose (KAUFFMAN *et al.*, 2002).

O principal mecanismo, porém, de injúria vascular causado por homocisteína está relacionado com a diminuição da biodisponibilidade de óxido de nítrico, NO, derivado de endotélio vascular (FARACI *et al.*, 2003). NO é um potente vasodilatador que ativa guanilato ciclase solúvel nos músculos lisos vasculares, resultando num acúmulo de GMP cíclico e relaxamento (CAI *et al.*, 2000). Ele é produzido pela NO sintase endotelial (eNOS) em resposta ao estímulo fisiológico como acetilcolina (Ach), trombina e bradicinina e, é um grande mediador de relaxamento dependente de endotélio tanto em artérias de grande como de menores calibre (CAI *et al.*, 2000). Stamler (1993) e Upchurch (1997), demonstraram que o prejuízo da biodisponibilidade de NO em cultura de

células endoteliais é consistente com a mesma observação em animais modelos de hiperhomocisteinemia. A diminuição na oferta de NO também pode contribuir para trombose e aterosclerose, já que NO liberado pelo endotélio inibe agregação plaquetária e adesão de leucócitos (WELCH *et al.*, 1998).

A causa da queda de biodisponibilidade de NO na hiperhomocisteinemia é multifatorial (FARACI *et al.*, 2003), mas dados da literatura utilizando modelos animais de hiperhomocisteinemia, sugerem que o estresse oxidativo induzido pela homocisteína é o principal mecanismo lesivo, acarretando acelerada inativação oxidativa de NO.

Vários tipos de espécies reativas de oxigênio, incluindo superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais hidroxila, podem contribuir para a inativação oxidativa do NO produzido pelo endotélio na hiperhomocisteinemia (EBERHARDT *et al.*, 2000; FARACI *et al.*, 2003).

A produção de superóxidos vasculares em animais com hiperhomocisteinemia pode ser atenuada pela administração de apocinina, um inibidor de NADPH oxidase (DAYAL *et al.*, 2004), o que sugere que a NADPH oxidase vascular pode contribuir para o estresse oxidativo mediado por superóxidos (CAI *et al.*, 2003).

Superóxidos reagem com NO para produzirem um potente oxidante, o peroxinitrito, que causa prejuízo nas vias de sinalização do NO, pela oxidação da tetrahydrobiopterina e desacoplamento na NO-sintase endotelial, condição na qual a eNOS pode produzir mais superóxido do que NO (LANDMESSER *et al.*, 2003; KUZKAYA *et al.*, 2003).

A depleção gênica de uma enzima antioxidante, glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) em animais homozigotos (Gpx-1^{-/-}) demonstra um menor relaxamento intrínseco dependente de endotélio em artérias aortas, na ausência de quadro de hiperhomocisteinemia e, uma severa disfunção endotelial é aumentada para o mesmo animal quando submetido a uma dieta hiperhomocisteinêmica (DAYAL *et al.*, 2002). O mecanismo de efeito protetor da Gpx-1 pode ser relatado para a redução de peróxido de hidrogênio, peróxido lipídeos ou peroxinitritos (SIES *et al.*, 1997).

A dimetilarginina assimétrica (ADMA) é um inibidor endógeno das NO-sintases que é produzida pela proteólise de proteínas que contêm resíduos de arginina metilada (BÖGER, 2003). Elevada concentração plasmática de ADMA é um emergente fator de risco cardiovascular que é prevalente em pacientes com hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, diabetes mellitus e hipertensão (BÖGER, 2003). Na inibição da produção de NO endotelial, ADMA pode também promover desacoplamentos de eNOS, contribuindo diretamente para o aumento do estresse oxidativo (BÖGER, 2003). A elevação de ADMA plasmáticas, na hiperhomocisteinemia, pode ser causada pelo aumento da metilação de proteínas contendo resíduos de arginina, dependente de S-adenosilmetionina (SAM, figura.04), diminuindo a excreção renal de ADMA, ou diminuindo atividade da enzima DDAH – dimetilarginina dimetilhidrolase que metaboliza ADMA (STUHLINGER *et al.*, 2001).

Portanto, o maior fator contribuinte para a disfunção endotelial na hiperhomocisteinemia é a diminuição da biodisponibilidade de NO, que pode ser

causado pelo estresse oxidativo e/ou ADMA. O estresse oxidativo induzido pela homocisteína pode ser mediado pelo desacoplamento da eNOS, ativação de enzimas pró-oxidantes, como a NAD(P)H oxidase e/ou diminuição da atividade anti-oxidante de enzimas como a glutathiona peroxidase (figura.05):

Figura.05. **Quadro resumo das possíveis ações da homocisteína na lesão endotelial.** Adaptado de LENTZ, 2005.

2. Objetivos

2.1) Geral

Avaliar a participação da galectina-1 nos eventos iniciais da lesão vascular em camundongos, submetidos ao procedimento de hiperhomocisteinemia moderada.

2.2) Específicos

- Análise temporal do modelo de hiperhomocisteinemia moderada, monitorado por: detecção de homocisteína total plasmática por espectrometria de massa; avaliação de reatividade vascular em aortas e, determinação de rolamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas;
- Avaliação da reatividade vascular em anéis de aortas de animais selvagens e destituídos do gene para Gal-1, em resposta ao agostista contráctil fenilefrina, na presença e ausência de Gal-1 exógena.
- Detecção da expressão de iNOS e eNOS em aortas de camundongos selvagens controles e tratados com homocisteína-tiolactona e, animais controles destituídos do gene da Gal-1, em níveis protéico (imunohistoquímico) e gênico (RT-PCR). Conseqüente análise da concentração plasmática de NOx ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$)

- Detecção de Gal-1 em aortas de camundongos selvagens controles e tratados com homocisteína-tiolactona, em níveis protéicos (Western-blot e imunofluorescência) e gênico (Real Time PCR).

3. Material e métodos

3.1) Obtenção da galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1)

3.1.1) Obtenção do extrato bruto bacteriano

A Gal-1 foi obtida de cultura de bactérias (*E. coli* cepa M-15) transformadas com plasmídio PQU-50 contendo o gene completo da galectina-1 conforme descrito por Cho & Cummings (1995). As bactérias citadas foram cedidas pelo Prof. Dr. Richard Dale Cummings, chefe do Laboratório de Glicobiologia e do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Emory de Atlanta, Georgia – EUA.

As bactérias foram cultivadas em 200mL de meio LB Broth Base (Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) com ampicilina (50µg/mL) (USB Corporation, EUA) em um agitador (200rpm) à 37°C, por 14-16 horas. Após este período, e constatado o crescimento bacteriano, foram transferidos 25mL desta cultura para 1L de meio LB, previamente autoclavado contendo 500µL de ampicilina (50µg/mL). Em seguida, esta suspensão bacteriana foi incubada em agitador (200rpm) a 37°C por 2 horas. Após este período de incubação, mediu-se a densidade óptica (DO) em 600nm para averiguar a taxa de crescimento bacteriano e foi considerado ótima quando foi atingida a faixa de DO (600nm) entre 0,45 - 0,5. Em seguida, adicionou-se a cultura 0,36g de isopropil β-D-tiogalacto-piranozídeo (IPTG, Promega, WI, EUA) diluído em 1mL de meio LB,

para a indução da expressão da galectina-1 (Gal-1) pelas bactérias. O cultivo foi novamente iniciado no agitador (37°C - 250 a 300rpm) por 4 horas. Após este período de incubação, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000xg por 15-20 minutos a 4°C. O *pellet* da cultura foi centrifugado a 3000g por 15-20 minutos a 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi armazenado a -70°C por no máximo 2 semanas.

3.1.2) Purificação da Gal-1

O *pellet* bacteriano foi submetido ao descongelamento em banho de gelo e em seguida ressuspendido em um tampão de lise constituído por:

- 7mL de PBS autoclavado (Phosphate Buffered Saline – NaCl (136,8mM); KCl (2,7mM); Na₂HPO₄ (6,4mM); KH₂PO₄ (0,9mM) pH7,4.
- 14 mM de β-mercaptoetanol (2-ME) (Merck-Schuchardt, Alemanha)
- 1 tablete de inibidores de proteases sem EDTA (Roche Diagnostics GmbH, M,Alemanha)
- 1mL de lisozima -1mg/mL (Roche Diagnostics GmbH, M, Alemanha)
- 10μL de RNase A Tipo 3A – 10mg/mL (Sigma-Aldrich)
- 10μL de DNase I Tipo IV – 10mg/mL (Sigma-Aldrich)

O *pellet* das bactérias foi incubado por 30 minutos com o tampão de lise em banho de gelo. A amostra foi sonicada em 5 ciclos de 20 segundos cada, na potência de 40W (Sonics Vibra cell; SONICS & MATERIALS INC.), sendo que

entre os ciclos a suspensão foi mantida em repouso por 15 segundos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 10000xg por 45 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e submetido à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose (Sigma-Aldrich) com 5mL de leite. O material não-ligante foi eluído com tampão de equilíbrio (PBS, adicionado de 14mM de 2-ME pH 7,4), sendo coletado 20 frações de 2mL. O material ligante à coluna foi eluído com tampão de eluição (Tampão de equilíbrio adicionado de 100mM de lactose, pH 7,4), sendo coletado 10 frações de 0,5mL. O procedimento cromatográfico foi monitorado pela leitura da DO em 280nm (UV Mini 1240, Shimadzu) e por eletroforese em gel de poliacrilamida.

As concentrações protéicas das soluções de Gal-1 foram determinadas por espectrometria utilizando as leituras de Densidade Óptica (DO) em 280nm com um caminho óptico de 1cm. Os valores de DO obtidos foram convertidos para concentração (mg/mL) utilizando o coeficiente de extinção molar ($\xi = 1,17$) desta molécula e a correção das diluições (fator de diluição = fD) pela seguinte fórmula:

$$\text{Concentração da Gal-1 [mg/mL]} = \xi \times \text{fD} \times \text{DO (280mM)}$$

As frações cromatográficas obtidas do procedimento de purificação de Gal-1 em agarose-lactose foram analisadas por eletroforese (*SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). As amostras contidas em tampão redutor e dissociante (volume final 20 μ L) foram aplicadas

em gel de poliacrilamida (15%) e submetidas à corrida eletroforética a voltagem constante (150V). O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue*. As seguintes amostras foram analisadas: lisado bacteriano bruto; material não-ligante no gel de agarose-lactose; frações cromatográficas. Uma mistura marcadores contendo proteínas com peso molecular conhecido foi utilizada como padrão de peso molecular (LMWH – *Low Molecular Weight Calibration kit for Electrophoresis* – GE, Amersham –Biosciences, Uppasala, Suécia).

As soluções da Gal-1 obtida da cromatografia em agarose-lactose foram mantidas em tampão de eluição, com a finalidade de preservar a atividade lectínica dessa proteína, e estocadas a -80°C até o momento do uso. Para os ensaios, estas soluções foram submetidas procedimento de dessalinização em cromatografia de exclusão molecular em coluna PD10 conforme instruções do fabricante (Sephadex-G25M; Pharmacia LKB, Uppasala, Suécia). As concentrações das soluções dessalinizadas da Gal-1 foram determinadas por meio de espectrometria conforme descrito acima.

Com o objetivo de avaliar o nível de preservação da atividade lectínica da Gal-1 purificada em resinas de agarose-lactose, amostras dessa proteína foram dessalinizadas em coluna PD-10 e imediatamente re-cromatografadas em coluna de agarose-lactose. Neste último procedimento, a eluição da Gal-1 com tampão de lavagem foi considerada um indicador da perda da propriedade lectínica dessa proteína, pois nestas condições a Gal-1 não foi capaz de reconhecer a lactose e por isso não foi retida na resina de agarose-lactose.

3.2) Controle da atividade lectínica por hemaglutinação

A oxidação dos grupos sulfidrílicos da Gal-1 e sua desnaturação podem promover a perda da atividade lectínica dessa proteína, uma propriedade associada a várias funções dessa molécula. Considerando que as soluções de Gal-1 purificadas foram estocadas a -80°C , e que deverão ser descongeladas para uso, foi analisado o impacto desses procedimentos na atividade hemaglutinante desta lectina.

A hemaglutinação foi realizada na presença ou ausência de açúcar-hapteno específico para a Gal-1, a lactose (20mM). A sacarose (20mM) foi usada como hapteno controle. As hemácias não desafiadas, incubadas apenas com PBS, foram consideradas como controle negativo. Diferentes concentrações de Gal-1 foram testadas (10, 8, 5, 4, 2, 1, 0.5, 0.250, 0.125, 0.065 μM). Para cada amostra de Gal-1 (50 μL) foram adicionados 50 μL de suspensão de hemácias humanas a 3% em PBS preparada a partir do sangue total heparinizado (Vacutainer) coletado de um doador sadio. A aglutinação das hemácias foi verificada após 2 horas. Somente as preparações de Gal-1 que apresentaram atividade hemaglutinante na concentração de 1 μM foram utilizadas nos diferentes ensaios.

3.3) Produção de Imunoglobulina de coelho policlonal anti-Gal-1 humana

3.3.1) Imunização de animal e obtenção de soro

200µg de Gal-1 humana purificada por cromatografia, diluídos em 300µL de PBS estéril, foram emulsificados com 300µL de adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e injetados por via intradérmica em 5 pontos do dorso de um coelho albino macho e adulto (New Zeland). Após quinze dias, foi feita uma segunda imunização com 200µg de Gal-1 emulsificada com adjuvante incompleto de Freund e, injetado intramuscularmente na coxa esquerda do mesmo animal. Posteriormente, foram realizadas 2 outras imunizações quinzenais, aplicando 200µg de Gal-1 emulsificada com adjuvante incompleto de Freund, alternando a aplicação em entre as coxas do animal.

Previamente à primeira imunização, foram colhidos 15mL de sangue total do coelho para obtenção de soro pré-imune. Para cada etapa posterior, de imunização, foram colhidos 15mL de sangue total, a fim de determinar, por ELISA, o título de anticorpos anti-Gal-1 no soro, comprovando, portanto, a eficiência do protocolo de imunização.

Passados 7 dias após a última imunização, o coelho foi devidamente anestesiado para uma colheita máxima de sangue total por punção cardíaca.

Separou-se o soro do coágulo por centrifugação a 2200rpm por 10 minutos e armazenou-se a -70°C até o momento da purificação.

3.3.2) *Purificação das imunoglobulinas anti-Gal-1 do soro de coelho*

Ao soro obtido por sangria do coelho imunizado foi adicionada solução saturada de amônio, cuja concentração ótima para precipitação de anticorpos é de 40%. Os precipitados foram solubilizados em PBS e dialisados exaustivamente nesse mesmo tampão, sob agitação e em câmara fria. Posteriormente, o dialisado foi cromatografado em coluna de Sepharose 4B ativada com brometo cianogênico (Pierce Co.) conjugada com Gal-1 recombinante humana. A coluna foi previamente equilibrada com PBS. As imunoglobulinas anti-Gal-1 do coelho foram, então eluídas com tampão Glicina 0,2M pH 2,8 e monitorados por absorbância a 280nm. Os pHs das frações correspondentes ao pico da eluição foram recolhidos e imediatamente neutralizados para pH7,4. Finalmente, as frações foram analisadas por ELISA.

3.4) *Animais*

Os experimentos foram realizados utilizando coelhos albinos machos e adultos (New Zeland) e camundongos da linhagem C57/BL6, selvagens (Gal-1^{+/+}) e destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}), machos e adultos, pesando de

25-30g. O presente trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética em Uso de animais (CEUA - USP, campus de Ribeirão Preto) em 08 de novembro de 2005 com o protocolo de número 05.1.801.53.0.

Os coelhos foram adquiridos junto ao Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Os camundongos (Gal-1^{+/+}) foram adquiridos junto ao Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Os animais (Gal-1^{-/-}) foram cedidos, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard Dale Cummings, chefe do laboratório de Glicobiologia e do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Emory, Atlanta, Georgia, USA.

Os animais foram mantidos com livre acesso de água e alimento, em temperatura constante de 22°C e em ciclo de luz de 12 horas (claro/escuro) junto ao Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

3.5) Implementação de modelo de hiperhomocisteinemia moderada em camundongos

3.5.1) Padronização do modelo

Para se obter um quadro experimental de hiperhomocisteinemia moderada segundo Frauscher, *et al*, 1995, camundongos selvagens machos e jovens da linhagem C57/BL6 foram divididos em grupos e submetidos à

padronização de concentração de DL-homocisteína-tiolactona (DL-HcyT - Acros Organics, Bélgica) administrada em água para os animais na finalidade de elevar a concentração plasmática total de homocisteína.

Para tanto, foram utilizados 26 camundongos subdivididos em quatro grupos, sendo três grupos, de sete animais cada, tratados oralmente com DL-HcyT diluídos em água potável e fornecida aos grupos em três concentrações de 0,1; 0,3 e 1,0g/Kg/dia. Um quarto grupo de cinco animais foi utilizado como controle, submetido à ingestão de água sem tratamento de DL-HcyT. Os animais, tratados ou controle, tiveram livre acesso à ração sólida.

Os grupos foram acompanhados diariamente por 15 dias sendo avaliados quanto à média diária de ingestão de líquidos, sólidos e massa corpórea média.

Após quinze dias de tratamento, os animais foram devidamente anestesiados para colheita de sangue total em presença de anticoagulante EDTA 4mg/mL. Foi colhido, através de pulsão retro-orbital, 1mL de sangue, que foi submetido à centrifugação (2500xg, 10 minutos) a fim de se coletar o plasma para dosagens séricas de homocisteína plasmática total por espectrometria de massa e de construir uma curva de concentração plasmática dose-resposta relacionada com a ingestão da solução aquosa de DL-HcyT (DL-HcyT_{aq}).

3.5.2 Protocolo de hiperhomocisteinemia

Camundongos machos e jovens da linhagem C57/BL6 selvagens ou destituídos do gene para galectina-1, agrupados para experimentação, foram tratados com DL-HcyT numa concentração padronizada de 0,4g por quilograma de massa corpórea por dia (0,4g/Kg/dia), diluída em 4mL de água potável e filtrada para cada animal.

3.6) Dosagem de homocisteína plasmática total

Foram feitas dosagens de homocisteína plasmática total para padronização e avaliação do modelo de hiperhomocisteinemia. Para tanto, o sangue total dos animais foram colhidos em tubos contendo EDTA 4mg/mL e mantidos em gelo. As amostras foram então centrifugadas a 2500xg durante 20 minutos a 4°C. As baixas temperaturas limitam a liberação de homocisteína das células sangüíneas, principalmente hemácias. O plasma esteve estocado a – 70°C até a dosagem.

As amostras foram então descongeladas, ao mesmo tempo dos reagentes padrões, calibradores e controles da técnica utilizada.

Em uma placa de 96 poços de polietileno teraftalato, foram pipetados 20µL: de água (branco), de padrões de calibração (curva de homocisteína: de 0, 7, 15 e 30 µmol/L), dos controles de qualidade (LIQUICHECK HOMOCYSTEINE CONTROL Level I e II, 12µM e 31µM, da Bio-Rad, usados um por vez e intercalado entre 9 amostras) e das amostras.

Seqüencialmente procedeu-se com a extração da amostra do plasma, onde pipetou-se, na ordem, 20µL de padrão interno (homocistina-*d*₈ a 10µmol/L), 20µL da solução ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich Sta Louis, MO, USA) a 500mmol/L, 60µL de água milliQ e, por fim 100µL da solução de precipitação (Sulfato de Zinco 0,2 mol/L em 80% de metanol grau HPLC). Selou-se então a placa com filme adesivo, agitou-a em Vortex e centrifugou a mesma por 3 minutos a 3000xg.

Após a extração, fora feita análise cromatográfica LC-MS/MS no equipamento Waters Micromass® Quattro Premier™ equipado com probe de *electrospray* e acoplado a Bomba de HPLC 1525µ da Waters e Amostrador 2777, Waters. Utilizou-se pré-coluna SecurityGuard C₁₈ Phenomenex (4 x 3,0 mm) e coluna Lichrospher C₁₈ 5u 50 x 2 mm (empacotada *in house*) a qual foi eluída em modo isocrático com 0,25mL/min de solução de formiato de amônio a 0,5mmol/L e 60% de acetonitrila. A técnica permite linearidade de até 250µmol/L e limite de quantificação de 5µmol/L).

Tal procedimento foi feito no *Fleury* – Centro de Medicina Diagnóstica, em São Paulo, SP, sob supervisão e orientação de Valdemir Melechco Carvalho, PhD, Assessor Científico Sênior.

3.7) Análise da reatividade vascular de aortas

Camundongos machos e jovens da linhagem C57/BL6 selvagens (Gal-1^{-/-}) e destituídos do gene para galectina-1 (Gal-1^{+/+}), submetidos ou não ao protocolo de hiperhomocisteinemia moderada, foram devidamente anestesiados com tribromoetanol e exsangüinados. Segmentos de artérias aorta foram removidos e manuseados sob solução completa de Kreb's (em mM: NaCl 118,4; KCl 4,7; CaCl₂ 1,9; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; C₆H₁₂O₆ 11,6; pH 7,4). Delas foram feitos cortes em anéis de segmentos de 4 mm de comprimento, sendo atravessados por dois ganchos de inox (espessura inferior a 0,15mm), inseridos no lúmen da mesma para produzir tensão do vaso, na presença e ausência de endotélio.

Os anéis foram inseridos em cubas de órgão isolado (5mL) contendo solução de Kreb's, mantidos a 37°C e aerados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% de CO₂).

Um dos ganchos foi conectado ao um suporte fixo ajustável e, o outro, a um transdutor para registro de contração isométrica (Tri 201 - Letica, Espanha). Os resultados das contrações foram agrupados e analisados pelo programa PROTO 5 - Letica, Espanha, em computador conectado ao transdutor.

Para estabilizar o sistema e permitir resultados confiantes, antes do início do protocolo experimental, as aortas foram repousadas sob tensão de 1,0xg, determinada através de curvas de tensão, durante 60 minutos. Após o período de estabilização, a viabilidade da preparação foi testada com fenilefrina (10⁻⁷ M).

As ações contrácteis e relaxantes dos vasos foram estimuladas e analisadas para todos os grupos em ambos preparos, com e sem endotélio (este

último sendo removido por atrito nas paredes do vaso entre si). A integridade do endotélio foi então verificada com a administração de acetilcolina (10^{-6} M) após pré-contracção com fenilefrina (10^{-7} M).

Foram, então, realizadas curvas cumulativas concentração-efeito para fenilefrina (Phe) nas concentrações entre 10^{-10} - 10^{-5} M (11 pontos) em artérias na presença e ausência de endotélio vascular e, acetilcolina (Ach 10^{-10} - 10^{-5} M, 11 pontos) para vasos com endotélio.

As drogas utilizadas nesses experimentos, Phe e Ach, foram diluídas em água deionizada. No entanto, a Gal-1, também utilizada, estava em tampão PBS. A quantidade de solvente nos meios de incubação foi menor que 0,1% do volume final presente na cuba. Portanto, a concentração dos diluentes não teve efeitos sobre as repostas dos agonistas estudados.

3.8) *Análise de disfunção vascular por microscopia intravital*

Camundongos, machos e adultos, selvagens (Gal-1^{+/+}) e destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}), foram submetidos a três tempos de tratamento com 0,4g/kg/dia de homocisteína-tiolactona: 24 horas, 7 e 15 dias, além de grupos controles. Nestes, pretendeu-se avaliar parâmetros de rolamento e aderência de leucócitos na parede endotelial de vênulas do mesentério. Para tanto, foi empregada técnica de microscopia intravital previamente descrita (BAEZ, 1969; RHODIN, 1986; FORTES *et al.*, 1991).

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de coral 4% e o mesentério exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida a 37°C, dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida por irrigação com solução salina estéril e aquecida a 37°C. A placa aquecida foi mantida sobre o “charriot” de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estavam acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, uma câmera e um monitor de vídeo, que permitiram a projeção e gravação das imagens. O aumento final do sistema foi de 3400 vezes.

Foram selecionados para o estudo vênulas pós-capilares com diâmetro variando de 10 a 16 μ M. foram analisadas três vênulas por animal, durante 10 minutos, estimando-se o valor médio para os parâmetros analisados: rolamento, adesão e transmigração de leucócitos. Os resultados de rolamento foram expresso por número de leucócitos que rolaram por minuto por vaso. Para adesão, foi analisado o número de células aderidas ao endotélio ao longo de uma extensão de 100 μ m² de vênula. Esta foi definida na tela do monitor: 10 μ m no tecido correspondiam a 3,4cm na tela.

Esse experimento foi realizado em colaboração com o prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha, em seu laboratório de Inflamação e Dor, no departamento de Farmacologia da faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

3.9) Determinação bioquímica de metabólitos plasmáticos

Parâmetros bioquímicos foram analisados segundo protocolo dos fabricantes. HDL (*High Density Lipid* – lipoproteínas de alta densidade), TGO/AST (Transaminase Glutâmica Oxalacética/Aspartato Amino Transferase), TGP/ALT (Transaminase Glutâmica Pirúvica/Alanina Amino Transferase) e Albumina, foram dosados segundo o kit e protocolo da Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Ácido Úrico, Glicose Creatinina, Triglicérides e Colesterol total foram dosados segundo kits e protocolos da fabricante SERA-PAK (Bayer Co. Buenos Aires, Argentina).

As análises foram feitas em amostras de plasma, através de colheita sangüínea em tubos contendo EDTA 4mg/mL e mantidos em gelo. As amostras foram então centrifugadas a 2500xg durante 20 minutos a 4°C. O plasma esteve estocado a –70°C até a dosagem.

Para tanto utilizou-se quatro “pools” de três amostras para o grupo Controle e, 3 “pools” de três amostras para os grupos de animais tratados com 0,4g/Kg/dia Hcy-T_{aq} (12, 24 e 48 horas, 7 e 15 dias) em analisador bioquímico TECHNICON RA-XT™ System, junto a unidade do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –USP.

3.10) Determinação da concentração de nitrato em soro sangüíneo

A concentração de nitrato no soro de camundongos (selvagens e destituídos do gene da Gal-1) tratados, ou não, com Hcy-T_{aq} foi determinado enzimaticamente pela redução do nitrato pela nitrato redutase. Resumidamente, 40µL do soro não diluído foi incubado por 2 horas a 37°C com o mesmo volume de tampão da enzima (0,1M de fosfato de potássio, pH7,5 contendo 1mM de fosfato de dinucleotídeo nicotinamida adenina, 10mM de dinucleotídeo flavina adenina e, 4U/mL da enzima redutase). Foi determinado, em paralelo, a leitura de uma curva de calibração com nitrato de sódio (0,5-50µM).

O total de nitrito, por amostra, foi, portanto, determinado pelo método colorimétrico de Griess, como descrito por GRENN *et al.*, 1982. Resumidamente, as amostras foram incubadas com o mesmo volume do reagente de Griess (sulfonilamida 1%, naftiletilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5%). Posteriormente foram medidas as densidades ópticas das amostras em espectrofotômetro (UV mini 1240 Shimadzu) a 550nm e os resultados expressos em µM de NO₃ (NO₃ + NO₂ plasmáticos).

3.11) Contagem de células sanguíneas

Camundongos selvagens (Gal-1^{+/+}), tratados ou não com Hcy-T_{aq}, foram anestesiados intraperitonealmente com hidrato de coral, 4%. Foi feita colheita de uma amostra sangüínea (±100µL) por punção retro-orbital. Desse volume de sangue, 10µL foi utilizado para contagem diferencial de leucócitos no ABX

MICROS 45, avaliando numero de monócitos, granulócitos, linfócitos, além de contagem de plaquetas.

3.12) *Preparo de lâminas histológicas de cortes de artérias aorta*

Camundongos, machos e adultos, selvagens (Gal-1^{+/+}) e destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}), submetidos ou não ao protocolo de hiperhomocisteinemia moderada, foram anestesiados intraperitonealmente com hidrato de cloral (4% em água). Após colheita de sangue total, o animal foi aberto ventralmente a partir de seu abdômen até a cavidade torácica, expondo seus órgãos internos. 5mL de tampão fosfato (PBS) foram perfundidos, em fluxo lento, pelo ventrículo esquerdo do coração, a fim de se eliminar sangue e coágulos residuais da circulação, principalmente da artéria aorta. Todo o lavado foi extravasado pelo átrio direito que fora previamente aberto.

Sequencialmente foram removidos os pulmões, coração e veia cava, expondo, portanto, a extensão da artéria aorta abdominal. Esta foi então removida no maior comprimento possível, incluída, estendida, em OCT TissueTek (Corning Inc) e, congeladas em acetona PA (Merck, Brasil) a -80°C, temperatura a qual as amostras foram armazenadas em freezer.

Cortes de 10µm de espessura foram feitos dos preparados congelados em criostato (Leica) e repousados sobre lâminas de microscopia previamente

preparadas com silano (*Silane* Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). As lâminas foram então armazenadas a -80°C.

3.12.1) *Histologia das artérias aorta*

Lâminas preservadas a -80°C contendo cortes, em triplicata, de artérias removidas de animais Gal-1^{+/+} controle e tratados por três tempos diferentes: 48 horas, 7 e 15 dias, com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq}, foram deixadas em vácuo (-25kPa/pol de Hg) por duas horas. Após esse processo de aderência, precedeu-se com bateria de coloração dos cortes com Hematoxilina e Eosina (de Harris) e montagem de lâmina e lamínula com Permount (Electron Microscopy Science, Fort Washington, USA).

Foi feita visualização dos cortes em microscópico óptico Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc.) no aumento de objetiva 40X e registro das imagens câmera digital Nikon DXM 1200 (Nikon Instruments Inc.) acoplada ao mesmo microscópico.

3.12.2) *Imunohistoquímica - Peroxidase*

Lâminas preservadas a -80°C contendo cortes, em duplicata, de artérias removidas de animais, Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}, controles e tratados, por três tempos diferentes: 48 horas, 7 e 15 dias, com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq}, foram deixadas em vácuo (-25kPa/pol de Hg) por três horas. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS por 5 minutos cada e incubadas por 45 minutos no escuro com 3% peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merk) em metanol, para inibir a peroxidase endógena. Em sequência, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas com bloqueio contra ligações inespecíficas. Foi utilizado BSA 2% em PBS contendo TritonX-100 0,1% por 45 minutos. Depois, lavaram-se 3 vezes os cortes com PBS e incubaram-se os antirpos primários.

Foram feitos duas marcações nos cortes de artérias. Empregaram-se anticorpos para detecção das expressões das óxido nítrico sintases (NOSs). Para tanto, utilizaram-se dois anticorpos comerciais, da Santa Cruz Biotechnology, feitos em coelho: anti-NOS2 (anti-NOS induzida) e anti-NOS3 (anti-NOS endotelial), ambos na concentração de 0,66µg/mL. Os anticorpos foram diluído em BSA 1% em PBS e incubados com as lâminas experimentais por 1 hora. Foi ainda utilizado BSA 1% em PBS como controle negativo em lâminas sem a incubação com o anticorpo primário. Decorrido esse tempo, novas seqüências de lavagens foram feitas e incubou-se o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho produzido em cabra e biotinilado (Vector Laboratories), na concentração de 150µg/mL, diluído em BSA 1% em PBS, por 45 minutos. Lavou-se, novamente, as lâminas e incubaram-nas com o complexo ABC (Vector Laboratories), intensificador de sinal, por mais 40 minuto. Por fim, as lâminas foram lavas e reveladas 10

minutos com solução de DAB (10mg 3,3'diamino benzidina – Sigma Aldrich), em 10mL de PBS, 100µL de H₂O₂ a 30%. Os cortes foram lavados, contracorados com Hematoxilina de Harris, desidratadas, diafanizadas e montadas em meio Entellan (Merk) e lamínula.

3.12.3) *Imunofluorescência*

Lâminas preservadas a -80°C contendo cortes, em duplicata, de artérias removidas de animais, Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}, controles e tratados, por três tempos diferentes: 48 horas, 7 e 15 dias, com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq}, foram deixadas em vácuo (-25kPa/pol de Hg) por três horas. Após esse processo de aderência, as lâminas foram deixadas imersas e em repouso em tampão fosfato (PBS) por um mínimo de 2 horas, sendo então os cortes incubados por 14-16 horas a temperatura ambiente com solução de bloqueio contendo 2,5µg/mL de FcBlock (IgG de rato anti-CD16 e anti-CD32 de camundongo, BD Bioscience), 50µg/mL de IgG purificada de burro (Jackson ImmunoResearch) e 3% de BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em TBS (100mM de NaCl, 100mM de Tris-base, pH8,0).

As lâminas, então, foram lavadas duas vezes e por 5 minutos em TBS e incubadas em seguida por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo policlonal de coelho anti-Gal-1 diluído em solução TBS contendo 1% de BSA. Decorrido esse tempo, lavaram-se novamente os cortes: 2 vezes de 15 minutos

cada com TBS/Triton X-100 0,1%; 2 vezes em TBS/Tween20 (Acros Organic, Bélgica) por 15 minutos cada; 2 vezes de 5 minutos em TBS. Incubaram-se então as lâminas com anticorpo IgG de burro anti-IgG de coelho acoplado a fluoróforo Alexa 594 (Molecular Probe) 1µg/mL, diluído em TBS/Tween20 0,05% em presença de DAPI 6µM, por 1 hora a temperatura ambiente no escuro.

Lavaram-se novamente os cortes em TBS/Tween20 0,05% quatro vezes de 15 minutos cada e, enxaguaram-se, rapidamente, as lâminas em água destilada deionizada (milliQ) antes de montar o sistema lâmina-lamínula, utilizando Fluoromount-G:TBS 1:2 (Electron Microscopy Science, Fort Washington, USA).

Conservam-se as lâminas secas e seladas com esmalte (sem formol na composição) a temperatura de 4°C. A observação experimental foi feita em microscópio confocal SP5 (Leica Microsystems AF6000) e os registros das imagens foram obtidos utilizando Image J (v. 1.37).

3.13) SDS-PAGE e Western Blotting

As amostras de artérias aortas foram extraídas de camundongos C57/Bl6 selvagens, adultos e machos tratados ou não com Hcy-T_{aq} (0,4g/Kg/dia, pela ingestão de água) por 12, 24 horas, 7 e 15 dias. As artérias aortas dos animais de cada grupo (n=5) foram removidas, como descrito anteriormente, e maceradas juntas em nitrogênio líquido na presença de tampão de

homogeneização (14mM de β -mercaptoetanol, 50mM de lactose em PBS). Para cada grupo de amostras, foi obtida uma massa média total de 60mg de aortas isoladas a qual foi diluída em 1,5mL de tampão de homogeneização. Todos os homogenatos foram centrifugados por 10 min a 10000xg e, dos sobrenadantes de cada preparação foram recolhidos volumes correspondentes a 400 μ g da massa total de cada “pool” de aortas. Finalmente, estas amostras de cada sobrenadante foram submetidas a *SDS-PAGE*, em condições redutoras, realizada em minigel de poliacrilamida em concentração de 12,5% utilizando tampão convencional de corrida, contendo Tris-Glicina e 0,1% SDS (Sigma Chemical Co, USA).

As proteínas foram, então, eletrotransferidas do gel para membrana de nitrocelulose (0,22 μ m; *Hybond – Amersham Biosciences*, Alemanha) por 1,5h 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* para proteínas. A etapa de bloqueio foi realizada pela incubação das membranas com solução de PBS contendo 5% de leite bovino desnatado, por 12-14 horas sob branda agitação.

Seqüencialmente, a membrana foi incubada com 0,25 μ g/mL de anticorpo policlonal de coelho anti-Gal-1 humana, diluído em PBS contendo BSA 1%, por 1,5 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi submetida a três lavagens com PBS/Tween20 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 coelho conjugada com peroxidase (*HRPO: Horseradish Peroxidase*

Conjugated - Jackson ImmunoResearch- USA) por uma hora. Três etapas de lavagens foram repetidas. A imunorreatividade para Gal-1 foi detectada usando o kit *ECL Western Blot* (Amersham Biosciences, Alemanha) e filme fotográfico (*Hyperfilm™ ECL™* – Amersham Biosciences, Alemanha).

3.14) Análise de expressão gênica por Real Time PCR

3.14.1) Extração de RNA total

Artérias aorta de camundongos C75/BL6 selvagens e destituídos do gene para galectina-1, submetidos, ou não, ao protocolo de hiperhomocisteinemia moderada, pelos tempos de 24 horas, 7 e 15 dias, foram subtraídas (protocolo previamente descrito) e RNA total extraído pela técnica do TRIzol (Invitrogen, NY, USA), segundo protocolo do fabricante. Resumidamente, dois grupos de amostras, 5 aortas de animais tratados e 5 aortas de animais controle foram macerados, isoladamente, na presença de nitrogênio líquido. Foi adicionada 800µL de TRIzol para cada 10mg de tecido e homogeneizado por maceração. Centrifugaram-se as amostras a 4°C, por 10 minutos a 12000xg para retirada de material insolúvel e gorduras. Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, aos sobrenadantes foram adicionados 200µL de clorofórmio por cada 1mL de TRIzol inicial. Foi realizada mais uma incubação a temperatura ambiente de 3 minutos, seguida de outro passo de centrifugação a 4°C, por 15 minutos a

12000xg. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo, onde se adicionou isopropanol (0,5mL para cada 1mL de TRIzol). Misturou-se gentilmente a solução que ficou repousando a temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente foi centrifugada a 4°C, por 15 minutos a 12000xg. O RNA total pelletado foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 4°C, por 5 minutos a 7500xg. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi deixado a temperatura ambiente para secar, sendo seqüencialmente dissolvido em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato, Ambion).

O RNA constituído teve sua concentração e pureza avaliada por leitura e razão de absorbâncias a 260 e 280nm em espectrofotômetro Mini UV1240 (Shimadzu, Japan).

Um micrograma do RNA total de cada amostra foi utilizado na síntese de 50µl de cDNA, utilizando o kit “High Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA), segundo protocolo do fabricante. O cDNA foi então diluído, em água DEPC, 5 vezes para uso nas reações.

3.14.2) Amplificação de DNA por Real Time PCR

A metodologia de PCR em tempo real consiste em acompanhar o número de cópias formado na reação de PCR, a cada ciclo. O número de cópias é proporcional à fluorescência quantificada pelo aparelho que pode ser oriunda da

liberação (e ativação) de um fluorocromo preso a uma sonda específica (método TaqMan) ou pelo intercalamento (e aumento de fluorescência) de moléculas fluorescentes nos produtos de PCR formados (método SYBRGreen). Uma vez feita amplificação, um limite de fluorescência (na fase exponencial da amplificação) é estipulado de forma a determinar o ciclo em que cada amostra alcança este limite de detecção, chamado de CT (*Cycle Threshold*).

Para normalizar os valores de CT determinados para as diferentes amostras, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA, utilizadas nas reações, o CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene *house-keeping* (neste trabalho foi usado para GAPDH) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Para um mesmo gene, os valores de Δ CT podem ser diretamente comparados, obtendo uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras possivelmente analisadas. A cada ciclo, o número de cópias numa reação de PCR duplica, assim, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT de uma outra amostra de referência ($\Delta\Delta$ CT) reflete a diferença relativa do nível de expressão existente entre as amostras, sendo obtida aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (PFAFFL, 2001). Para cada gene avaliado, o valor mediano de Δ CT das amostras de um gene controle (C) foi utilizado como referência, a fim de obter valores de expressão relativos à essa amostra de referência.

Foi realizada a quantificação relativa do gene da galectina-1 nas amostras de artérias de animais dos diferentes grupos tratados em relação ao grupo e em

comparação aos animais destituídos do gene para a galectina-1, utilizando o gene para GAPDH como normalizador. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando primers específicos em conjunto com o reagente SYBrGreen Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Os primers utilizados para detecção do nível de expressão relativa de galectina-1 nas amostras foram 2 conjuntos para o mesmo gene:

Lgals1-M-F1: GGTGGAGCAGGTCTCAGGAA,

Lgals1-M-R1: ACCAGACCACAGGCCATGAT.

Lgals1-M-F2: CGGACGCCAAGAGCTTTGT,

Lgals1-M-R2: TGAAGTGTAGGCACAGGTTGTTG.

A amplificação foi realizada em um volume final de 20 μ l, utilizando 10 μ l do reagente específico *SYBrGreen Master Mix*, 1 μ l do mix específico de sonda, 0,5 μ l de cada primer específico (F - *forward* e R - *reverse* para cada conjunto), 4 μ l de H₂O, e 5 μ l de cDNA diluído (equivalente a aproximadamente 20ng de RNA total). Um aparelho de detecção de PCR em tempo real *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) foi utilizado juntamente com o software *Sequence Detection System V1.3* para obtenção dos valores de CT. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de Δ CT. O software GraphPad Prism V4.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) foi utilizado para gerar os gráficos e para calcular a significância

estatística, aplicando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. As condições padrão de amplificação foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1min (anelamento e extensão simultâneos).

Os experimentos de extração de RNA e RT-PCR e Real Time PCR foram feitos no laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto, coordenado pelo prof. Dr. Marco Antônio Zago.

3.15) Reação em cadeia da polimerase do transcrito reversamente (RT-PCR)

Amostras de cDNA foram produzidas a partir de macerado de aortas de camundongos dos grupos de animais selvagens (Gal-1^{+/+}), tratados ou não com Hcy-T_{aq} e, de animais destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1^{-/-}), como previamente descrito.

Destas, 500ng foram submetidos a reação de PCR, para amplificação de seqüências que localizasse expressão dos genes para as enzimas *Óxido Nítrico Sintase endotelial* (eNOS) e *Óxido Nítrico Sintase induzida* (iNOS). Portanto, foram montadas 3 reações (tréplica) de 20µL por amostra contendo: 14,5µL de água deionizada, 2µL de tampão 10X de PCR (Invitrogen, Brasil), 1,5mM de MgCl (Invitrogen, Brasil), 0,8mM da mistura de oligonucleotídeos (Eppendorf

Hamburg, Alemanha), 0,2 μ M de cada primer e 1U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brasil) para cada 10 μ L de reação.

Os primers utilizados foram:

iNOS: senso: 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' e antisenso: 5'-GGGAGTAGCCTGTGCACCTGGAA-3'.

eNOS: senso: 5'-TTCCGGCTGCCACCTGATCCTAA-3' e antisenso: 5'-AACATATGTCCTTGCTCAAGGCA-3', amplificando fragmento de 340 pares de bases (pb) (LAUFS, *et al.*, 2002).

Preparadas, as reações foram incubadas no termociclador (Mastercycler, Eppendorf). A máquina foi programada para desnaturar a 94°C por 5 minutos, seguidos de um ciclo de 35 repetições em três passos: 94°C por 45 segundos de desnaturação, 55°C para alinhamento dos primer por 45 segundos e 72°C por 45 segundos para ação enzimática. Por fim estendeu-se um último passo de 72°C por 10 minutos, seguido por armazenamento a 4°C, até o momento de análise por eletroforese em gel de agarose (1,5%) e coloração com brometo de etídio.

3.16) Análise Estatística

A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos controle e tratados e entre os animais C57/Bl6 Gal^{+/+} e Gal-1^{-/-} foi a de variância variada

(ANOVA) “two-way”, seguido do pós-teste de Dunnett, ou teste t de Student não pareado, através do programa GraphPad Prism (versão 4 Prism, GraphPad, USA).

4. Resultados e Discussão

4.1) *Obtenção de galectina-1 recombinante humana*

As preparações de Galectina-1 recombinante humana (Gal-1) purificadas foram obtidas por cromatografia de afinidade em colunas de agarose-lactose de lisados de bactéria transformadas com o gene da galectina-1. A produção média da Gal-1 purificada foi de 40 mg/Litro de cultura de bactérias transformadas. O perfil cromatográfico da purificação da Gal-1 monitorizado pela DO em 280nm é mostrado na figura.06. O nível de preservação da propriedade lectínica da Gal-1 purificada foi avaliada por meio da re-cromatografia desta proteína em colunas de agarose-lactose. Os dados obtidos do procedimento de re-cromatografia indicaram que a Gal-1, previamente purificada, foi detectada apenas após a adição de lactose 100 mM em tampão de lavagem (figura.07.A). A análise eletroforética das frações cromatográficas demonstrou que a proteína apresentou alto grau de homogeneidade e migrou com massa molecular aparente de 14,9 kDa (figura.07.B). Estes resultados demonstram que a proteína obtida estava quantitativamente ativa e pura.

Figura.06. Perfil cromatográfico da purificação da Gal-1 a partir de extrato de *E. coli*. O lisado bacteriano bruto (7mL), obtido a partir de 2 litros de cultura, foi aplicado em uma coluna de agarose-lactose, como descrito em materiais e métodos. O material não ligante na coluna foi obtido pela lavagem desta com PBS acrescido de 2-ME (14mM) e o material ligante foi eluído com o tampão de lavagem acrescido de lactose (100mM – tampão de eluição). As frações coletadas durante a lavagem foram de 2mL (Frações 1-18) e as frações coletadas na eluição foram de 0,5mL. O procedimento cromatográfico foi monitorado pela absorbância em 280nm.

Figura.07. Perfil do procedimento de re-cromatografia das preparações da galectina-1 recombinante humana em coluna de agarose-lactose. (A) Preparações de Gal-1 obtidas, previamente, por afinidade em coluna de

agarose-lactose foram novamente aplicadas nessa coluna. A etapa de lavagem foi realizada com PBS contendo 2-ME (tampão de lavagem) e a de eluição com tampão de lavagem contendo lactose (100mM). Foram coletadas 20 frações de 1,0 mL cada. O processo de eluição foi monitorado pela determinação da concentração protéica (mg/mL) como descrito em materiais e métodos. (B) Análise eletroforética (SDS-PAGE) das frações cromatográficas obtidas do procedimento de re-purificação de Gal-1. As frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida (15%) em condições redutoras e dissociantes e o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue*. A massa molecular (MM) aparente da Gal-1 foi estimada com o auxílio de diferentes marcadores com MM de 52,2 a 7,4 kDa.

4.2) Análise da atividade hemaglutinante da Gal-1

As preparações de Gal-1 purificadas foram estocadas a -80°C até o momento do uso. Com a finalidade de analisar o nível de preservação da capacidade da Gal-1, purificada e estocada, de reconhecer glicanas foram realizados ensaios de hemaglutinação com essas preparações. Estes ensaios foram utilizados como um indicador da qualidade da Gal-1 para os ensaios realizados nesse estudo. As preparações de Gal-1, purificadas e estocadas que apresentaram atividade hemaglutinante detectável até 1µM foram utilizadas nos diferentes ensaios deste trabalho (figura.08.A). Na presença de lactose (20mM), os efeitos hemaglutinantes da Gal-1 (figura.08.B) foram completamente inibidos em todas as concentrações testadas destas lectinas. Entretanto, o uso do açúcar hapteno controle (sacarose – 20mM) não provocou nenhuma interferência detectável na reação de hemaglutinação de preparações de Gal-1 (figuras.08.C). Portanto, as preparações de Gal-1 utilizadas nos demais ensaios deste trabalho estiveram ativas e com perfil hemaglutinante homogêneo.

Figura.08. Perfil da atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1. Suspensões de hemácias humanas (3% em PBS) foram submetidas ao desafio com diferentes concentrações de Gal-1 (10, 8, 5, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 μM). A hemaglutinação foi realizada na presença ou ausência do açúcar-hapteno inibidor a lactose (20mM). A sacarose (20mM) foi usada como hapteno controle. As hemácias não desafiadas com Gal-1 foram consideradas como controle negativo de hemaglutinação (Ct). A aglutinação das hemácias foi registrada após 1 hora. O número destacado em vermelho representa a menor concentração hemaglutinante dessa lectina.

4.3) Produção de imunoglobulina policlonal de coelho anti-Gal-1

Duzentos microgramas de Gal-1, purificados e injetados quinzenalmente em coelho, foram suficientes para induzir resposta imunológica adaptativa específica, produzindo anticorpo policlonal anti-Gal-1, o qual foi testado quanto à capacidade de reconhecer Gal-1 imobilizada (1 μg por poço) em placa de ELISA. Tal desafio foi analisado com soros pré-imune e com os três soros imunes.

Os ensaios imunoenzimáticos, ELISA, comprovaram eficiência da imunização, através de reações controladas por diluições do soro bruto e uso de soro pré-imune, que não reconheceria Gal-1 imobilizada. Assim, foi demonstrado que os soros imunes apresentavam, temporalmente, concentrações crescentes de anticorpo anti-Gal-1 e que a cada imunização, soros mais diluídos seriada de 1:1000 até 1:64000 eram capazes de reconhecer de Gal-1 imobilizada (dados não mostrados).

Das preparações de imunoglobulinas totais, obtidas a partir da precipitação salina seguida de cromatografia de afinidade em colunas de Gal-1

imobilizada obtiveram-se 500µg de IgG anti-Gal-1 que foram diluídos em 1,2mL de PBS, portanto 416,6µg/mL. Amostras de IgG anti-Gal-1 purificadas forma capazes de reconhecer Gal-1 e não Gal-3 ou Gal-4, por meio da reação de ELISA, indicando a alto nível de especificidade desses anticorpos para Gal-1. Além disso, amostra dessa preparação de IgG, ao ser submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras e desnaturantes, mostrou-se homogênea. A figura.09 mostra que, sob condições redutoras, detectam-se bandas cujas migrações correspondem a massas moleculares aparentes de cadeia pesada (50 kDa) e a cadeia leve (25 kDa) de IgG. Em condições não-redutoras, detecta-se banda única de 150 kDa:

Figura.09. Análise Eletroforética da IgG anti-Gal-1 purificada de soro de coelho imunizado com Gal-1. Cinco microgramas do purificado por afinidade em coluna submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) em condições desnaturantes (Pista D) ou redutoras na presença 2-ME (pista C). Utilizou-se mistura de marcadores de alto e baixo peso molecular em condições desnaturantes (pistas A e B, respectivamente) e redutoras (pistas F e E). Valores de peso em KDa. Gel corado pelo método da prata.

4.4) Padronização do modelo de hiperhomocisteinemia moderada em camundongos

Na literatura científica, os estudos sobre modelos experimentais de hiperhomocisteinemia em camundongos são feitos em animais deficientes para genes das enzimas envolvidas no ciclo metabólico da metionina (LENTZ *et al.*, 2005). Portanto, esse trabalho é pioneiro na padronização de hiperhomocisteinemia moderada para camundongos, com ingestão de Hcy-T_{aq}.

Camundongos selvagens (Gal-1^{+/+}), machos e jovens, foram tratados, por 15 dias, com três diferentes concentrações de HcyT_{aq} (0,1; 0,3 e 1,0g/Kg/dia) para avaliar se o tratamento para modelo de hiperhomocisteinemia moderada interferiria no crescimento normal dos animais tratados em relação aos animais controle, não tratados. Além do acompanhamento individual da evolução de peso corpóreo, foram avaliados também a ingestão média de líquido (HcyT_{aq}) e ração, em relação a ingestão do grupo controle.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum grupo tratado em relação ao controle na evolução de crescimento animal, tendo um aumento de massa corpórea média, em 15 dias, de 18,15(±0,30)g para 20,69(±0,27)g. Não houve interferência do tratamento nas ingestões de líquidos, média de 4(±0.1)mL e de sólidos, média de 3,16(±0.06)g.

A concentração plasmática de homocisteína, em humanos, está entre 5 a 15µM em indivíduos sadios e em jejum (STILL; McDOWELL, 1998). O aumento desses valores é classificado como hiperhomocisteinemia (HHcy): moderada

(16-30 μ M), intermediária (31-100 μ M) e severa (acima dos 100 μ M) (KANG *et al.*, 1992).

Na literatura, a concentração plasmática de homocisteína em camundongos selvagens da linhagem C57/Bl6 varia entre valores de 3,2 μ mol/L (TROEN, 2005); 4,1 μ mol/L (KAMATH *et al.*, 2006) 5,3 μ mol/L (LENTZ *et al.*, 2000) e 6,1 μ mol/L (ZHOU *et al.*, 2004).

Para se obter um quadro de hiperhomocisteinemia moderada, houve a necessidade de padronizar a dose de DL-HcyT a ser administrada diariamente na água dos animais para atingir uma zona de concentração plasmática de homocisteína total na qual observasse um quadro moderado.

Assim formaram-se quatro grupos (n=7) de animais para avaliar o nível diferencial plasmático de homocisteína total. Foram 3 grupos de animais tratados com doses de HcyT_{aq} (0,1; 0,3 e 1,0g/Kg/dia) mais um grupo. O experimento foi realizado no tempo de 15 dias.

A análise quantitativa de homocisteína total, por espectrometria de massas, revelou um aumento expressivo de homocisteína plasmática proporcional ao maior consumo de DL-HcyT (figura.10). Foi observado um aumento significativo nos níveis plasmáticos para doses superiores a 0,3g/Kg/dia, fato não observado para o grupo tratado 0,1g/Kg/dia, que não variou em relação ao controle:

Figura.10. Padronização de dose de HcyT_{aq} para protocolo de hiperhomocisteinemia moderada. (A) Determinação de concentração de homocisteína plasmática total em camundongos selvagens C57/BL6 submetidos, ou não, ao tratamento de hiperhomocisteinemia moderada por 15 dias. (B) Curva representativa dose-resposta da dose de HcyT_{aq} e a concentração plasmática de homocisteína total (n=7).

De acordo com as dosagens da padronização de HHcy moderada por LC-MS/MS, adotou-se o tratamento com Hcy-T_{aq} na concentração de 0,4g/Kg/dia, dose superior a descrita por LEVINE *et al.*, 2005, em que foi utilizada dose de 0,2g/Kg/dia, porém inserida nos limites da HHcy moderada descrita por KANG *et al.*, 1992.

Desta forma, novo tratamento fora feito com seis grupos de animais Gal-1^{+/+}, machos e no vigor da idade sexual (60-75 dias de vida). Foram formados cinco grupos de animais tratados com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq}, acompanhados por 12, 24, 48 horas, 7 e 15 dias, além de grupo controle (tempo 0). Nesses tempos o sangue total fora colhido na presença de EDTA 4mg/mL, centrifugados e a concentração total de homocisteína plasmática determinada por LC-MS/MS (figura.11). O grupo controle, contendo de 15 animais fora dividido em 3

subgrupos para acompanhar três tempos de tratamento: 0 (zero) horas, 7 dias e 15 dias. Porém não foram observadas diferenças significativas entres os tempos dos subgrupos controles.

Figura.11. *Determinação da concentração plasmática de homocisteína total em camundongos selvagens C57/BL6 submetidos, ou não, ao tratamento de hiperhomocisteinemia moderada na dose de 0,4g/Kg/dia de HcyT por diferentes tempos (12, 24 e 48 horas, 7 e 15 dias).*

Os resultados mostram, para o grupo controle, um valor médio de $4,97(\pm 0,28)\mu\text{mol/L}$, houve aumento significativo, em relação ao grupo controle, para todos os grupos tratados, caracterizando um quadro de hiperhomocisteinemia moderada. Interessantemente, o grupo tratado por 24 horas se destaca por ter um aumento de homocisteína total maior e significativo em relação aos demais grupos tratados. Desta forma, o acúmulo de

homocisteína nesse tempo está na interface da hiperhomocisteinemia moderada e intermediária (31-10 μ M).

4.5) *Histologia das Artérias Aorta*

As artérias aorta dos camundongos Gal-1^{+/+} com hiperhomocisteinemia moderada foram avaliadas quanto à preservação e possíveis variações morfológicas.

A análise das imagens contidas na figura.12 sugere não haver diferenças significativas, em nível morfológico, para degradação endotelial ou mudanças do volume da musculatura lisa vascular para quaisquer tempos de tratamento (48 horas, 7 e 15 dias) em relação as artérias extraída de animais controle, sem tratamento. Porém, foi determinada, por observação, uma leve diminuição da espessura do tecido muscular dos grupos de animais tratados, em relação ao controle. Alternativamente, esta possível variação na espessura das artérias analisadas pode estar relacionada a artefato produzido no momento do corte em criostato.

Figura.12. Análise microscópica da morfologia das artérias aortas de camundongos Gal-1^{+/+} tratados ou não com homocisteína-tiolactona. A, representa duas aortas de animais controle, que não foram submetido ao tratamento com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq}. As demais são artérias de animais tratados por diferentes tempos: 48 horas (B), 7 dias (C) e 15 dias (D). Os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina e as imagens foram adquiridas em aumento de 100x de microscopia óptica.

4.6) Contagem de células sanguíneas

O modelo de hiperhomocisteinemia moderada experimental apontou um aumento significativo no número de granulócitos e plaquetas circulantes no sangue de animais Gal-1^{+/+} tratados, por 15 dias, com ingestão de 0,1; 0,3 e 1,0g/Kg/dia de homocisteína-tiolactona (Hcy-T). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas para as contagens de linfócitos e monócitos. Portanto, não houve variação nos valores totais de leucócitos (figura.13 e 14).

Figura 13. Contagem de leucócitos em sangue periférico de camundongos Gal-1^{+/+} tratados ou não com homocisteína-tiolactona por 15 dias. (A) apresenta contagem total de leucócitos circulantes. Da contagem diferencial, obteve-se número de células para granulócitos (B), monócitos (C) e linfócitos (D). *** representa diferença estatisticamente significativa com valor de $p < 0,001$.

Figura.14. **Contagem total de plaquetas em sangue periférico de camundongos Gal-1^{+/+} tratados ou não com homocisteína-tiolactona por 15 dias.** *** representa diferença estatisticamente significativa com valor de $p < 0,001$.

4.7) Análise sérica de metabólitos bioquímicos

Camundongos selvagens, Gal-1^{+/+}, submetidos ao modelo de hiperhomocisteinemia moderada e controle tiveram amostras dos plasmas sanguíneos dosados para determinantes bioquímicos a fim de se analisar se o tratamento experimental causou alterações dos níveis séricos de marcadores metabólicos.

As análises de marcadores de lesão renal, ácido úrico e creatinina demonstraram não haver alterações com diferenças significativas para os grupos tratados em relação aos animais controle. Porém foram observados um aumento significativo nos níveis de albumina para o grupo tratado por 24 horas e uma conseqüente diminuição de albumina plasmática nos tempos de 7 e 15 dias de tratamento (tabela.01).

Outros estudos, feito com outro modelo animal, ratos, demonstram que alterações de creatinina somente ocorrem após 4 semanas de tratamento (MIAO *et al.*, 2005) e que lesão renal acarreta também elevação de níveis de Hcy plasmáticos (DADZIE *et al.*, 2004).

Tabela.01. ***Dosagens plasmáticas dos níveis de ácido úrico, creatinina e albumina em animais Gal-1^{+/+} tratados, ou não, para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.***

controle	Tempo de Tratamento				
	12horas	24horas	48horas	7dias	15dias
Ácido Úrico (mg/dL)					
0,90±0,23	0,83±0,06	1,13±0,24	0,93±0,18	0,76±0,20	0,90±0,05
Creatinina (mg/dL)					
0,52±0,02	0,36±0,03	0,36±0,06	0,46±0,16	0,40±0,17	0,46±0,14
Albumina (mg/dL)					
2,35±0,08	2,50±0,15	2,56±0,03	2,43±0,08	2,13±0,03	2,10±0,05
		*		*	**

Valores em média±SEM

* P<0.05

** P<0.01

Alterações de AST e ALT sugerem extensão da lesão dos hepatócitos (KEW, 2000). A avaliação de possível lesão hepática causada pelo modelo experimental de HHcy, demonstrou que o tratamento não acarretou alterações para o marcador enzimático hepático AST. Na análise de ALT foram observados aumentos de concentração para os tempos de 12, 24 e 48 horas de tratamento (tabela.02).

Tabela.02. ***Dosagens plasmáticas das aminotransferases marcadoras de função hepática: ALT e AST em animais Gal-1^{+/+} tratados, ou não, para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.***

Controle	Tempo de Tratamento				
	12horas	24horas	48horas	7dias	15dias
ALT (mg/dL)					
52,25±1,87	116,33±8,68	144,67±22,2	115,67±46,8	86,66±24,23	95,34±21,73
	*	*	*		
AST (mg/dL)					
175,5±1,2	183,3±15,0	191,7±12,2	192,3±32,3	176,3±14,0	209,3±9,4

Valores em média $\pm$ SEM

* P<0.05

A análise da taxa sérica de glicose e do perfil lipídico (HDL, LDL, triglicérides e colesterol total) revelaram que o tratamento para hiperhomocisteinemia experimental causou destacáveis alterações, à exceção dos níveis de HDL plasmático que não apresentaram quaisquer variações, na comparação entre os grupos (tabela.03). Para análise de LDL, várias alterações significativas foram observadas (figura.15.A). Nota-se que em 48 horas de tratamento, os valores de LDL tiveram um aumento expressivo mínimo de quase 45 % em relação ao controle, aumento também significativo em relação aos tempos 12 e 24 horas de tratamento e conseqüente redução nos tempos de 7 e 15 dias.

As formas oxidadas de LDL podem induzir aumento da expressão de Gal-3 em macrófagos com morfologia de células gordurosas localizados em lesões ateroscleróticas (KIM *et al.*, 2003). Além disso, a Gal-3 parece estar envolvida na formação de lesões ateroscleróticas e isto parece estar relacionado com a incorporação de LDL oxidada por macrófagos localizados nessas lesões (ZHU *et al.*, 2001). Por outro lado, LDL oxidada pode provocar a expressão de Gal-1 por células endoteliais (BAUM *et al.*, 1995) e esta lectina pode induzir a proliferação da musculatura lisa dos vasos, um evento importante para instalação das lesões ateroscleróticas (MOISEEVA *et al.*, 2000). Interessantemente, a Gal-1 tem sido descrita como protetora de injúrias teciduais neuronal e/ou muscular (MIURA *et al.*, 2005, CHAN *et al.*, 2006).

Quanto aos valores de triglicérides, notou-se que o tratamento com Hcy-T_{aq} causou aumento dos níveis em 12 e 24 horas em relação ao controle e, os valores estiveram reduzidos no tempo de 15 dias em relação aos tempos de 12 e 24 horas e 7 dias (tabela.03 e figura.15.B).

Nas análises de Colesterol total, foram observadas duas alterações significativas, em relação ao controle (figura.15.C): uma redução taxa no tratamento em 12 horas e um progressivo aumento no tempo de 48 horas. Após esse ponto, a os níveis caem retornando aos valores basais, em 15 dias (tabela.03).

Tem sido mostrado que níveis plasmáticos de glicose poderiam, por si, causar alterações na reatividade vascular (XAVIER *et al.*, 2003). No presente estudo, foi observado pico significativo de glicose no tempo de 24 horas, tempo ao qual foi verificado também um aumento de expressão para Gal-1 (gênica e protéica). Também foram observadas reduções da concentração de glicose para os tempos de 7 e 15 dias em relação aos tempos controle e 24 horas.

Tabela.03. Dosagens plasmáticas glicose, LDL, HDL, triglicérides e colesterol total em animais Gal-1^{+/+} tratados, ou não, para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.

Tempo de Tratamento					
controle	12horas	24horas	48horas	7dias	15dias
HDL (mg/dL)					
58,25±1,49	55,67±4,37	65,34±3,38	61,0±3,78	57,0±3,785	51,50±6,50
LDL (mg/dL)					

24,55±6,48	15,00±2,00	21,60±1,28	47,67±2,73	21,27±1,68	28,70 ±1,50
Triglicérides (mg/dL)					
64,75±5,67	97,34±5,36	90,34±9,70	76,34±10,17	68,67±5,24	49,0±10,0
Colesterol Total (mg/dL)					
95,75±7,36	77,00±11,79	105,00±1,00	119,00±7,23	92,00±3,51	90,00±7,00
Glicose (mg/dL)					
186,75±20,6	204,67±12,4	231,33±3,18	164,33±2,73	135,0±7,1	143,33±17,5
Valores em média±SEM					
* P<0.05					
** P<0.01

Figura.15. **Dosagens séricas do perfil lipídico e glicose de camundongos *Gal-1^{+/+}* tratados com 0,4g/Kg/dia de *Hcy-T_{aq}*.** A expressa níveis plasmáticos de LDL em amostras de soro, obtido de punção cardíaca em presença de anticoagulante EDTA, de animais tratados, ou não, em cinco tempos de acompanhamento da HHcy moderada. B apresenta taxas de triglicérides dos aniamais e C e D, representam, respectivamente, valores de colesterol total e glicose.

4.8) **Imunodeteção de *Gal-1* em aortas, por técnica de western blot**

Foram analisados homogenatos de artérias de camundongos selvagens *Gal-1^{+/+}* tratados ou não com *Hcy-T_{aq}* por 12, 24 horas, 7 e 15 dias. A análise eletroforética das preparações das artérias aortas de cada grupo e a coloração

da membrana com Ponceau-S indicou que essas preparações continham quantidades semelhantes de proteínas e que a eletrotransferência de proteínas das diferentes preparações de artérias aortas foi eficiente e homogênea (dados não mostrados). A figura.16 mostra que a banda de 14kDa, referente a Gal-1, foi detectada em todos os extratos de aortas analisadas (controle e tratadas). Entretanto, a imunodeteção dessa banda protéica, pelo anticorpo anti-Gal-1, foi maior em amostras obtidas de artérias de animais Gal-1^{+/+} tratados por 24 horas (mais intenso) e 15 dias (menos intenso) em relação aos demais tempos de tratamento com Hcy-T_{aq} e ao nível basal. Salienta-se que, na ausência do anticorpo policlonal de coelho anti-Gal-1 (anticorpo primário) e na presença do anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (anticorpo secundário), não foi detectado nenhuma proteína nos extratos de aortas. O padrão de expressão da Gal-1 em extratos de aortas de animais experimentais para HHcy foi retificado pelo ensaio de *Real Time PCR*, posteriormente descrito.

Figura.16. **Detecção de Gal-1 em extrato de aortas de animais submetidos a HHcy moderada.** A banda de 14 kDa referente a Gal-1 foi a única detectada em cada extrato protéico de artérias de animais controles e tratados com Hcy-T_{aq}, nos tempos de 12h, 24h, 7 e 15 dias. A imunodetecção foi feita com auxílio do anticorpo policlonal anti-Gal-1 de coelho purificado por afinidade (anticorpo primário, AP). Foram realizadas reações na ausência do anticorpo primário e na presença do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase, controle do secundário). A revelação da imunoreatividade foi feita por quimiluminescência com tempo de exposição de 1 minuto.

4.9) Imunodetecção de Gal-1 em aortas, por fluorescência

Foram utilizadas secções de 10µm de artérias aortas (preparação previamente descrita) de animais Gal-1^{+/+} sem tratamento e tratados com Hcy-T_{aq} nos tempos de 48 horas, 7 e 15 dias.

O anticorpo utilizado para a detecção de Gal-1 é um policlonal feito em coelho e produzido em *in house* e é, portanto, seletivo e específico para apenas a Gal-1 do subtipo -1.

Nesse ensaio, utilizaram-se marcações com anticorpo anti-Gal-1 em 3 situações distintas. Primeiramente anti-Gal-1 foi incubado diretamente com os cortes, revelando reatividade, conduzindo a um sinal positivo de localização de Gal-1 tecidual em aortas. Foram também empregadas duas outras situações, onde o anti-Gal-1 fora previamente incubado com galectinas solúveis (por 30 min no gelo) A incubação feita com Gal-1 (20µM) foi capaz de bloquear 100% a ação do anticorpo em se ligar a Gal-1, em todos os cortes de aortas dos grupos

de camundongos Gal-1^{+/+} tratados e controle (figura.17.A-D). Por outro lado, a pré-incubação com Gal-4 (20µM), não específica e não reativa a anti-Gal-1, foi incapaz de inativar a ação do anticorpo. Assim, a preparação anti-Gal-1 + Gal-4 solúvel teve desempenho semelhante ao anticorpo isolado, detectando Gal-1 tecidual em aortas de todos os animais, tratados ou não (figura.17.E-H e I-L).

Entretanto, foi sugerida igual distribuição e imunolocalização de Gal-1 em aortas de quaisquer grupos de animais Gal-1^{+/+}, preferencialmente na musculatura lisa entre as camadas elástica interna e externa, como proposto por CHELLAN *et al.*, 2007.

Figura.17. Detecção de Gal-1, por imunofluorescência, em artérias de camundongos selvagens, Gal-1^{+/+}, tratados ou não com homocisteína-tiolactona. Preparações de artérias derivadas de animais Gal-1^{+/+} tratados com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq} por 48 horas (B, F e J), 7 dias (C, G e K) e 15 dias (D, H e L) foram incubadas com anticorpo de coelho anti-Gal-1, na presença de 20µM de Gal-1 solúvel (A, B, C e D) ou com 20µM de Gal-4 solúvel (E, F, G e H) e com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho conjugado a ALEXA 594). Em I, J,

K e *L* são apresentadas as marcações apenas para Gal-1, em detecção exclusiva para o espectro de emissão no comprimento de onda do fluoróforo ALEXA 594. Imagens adquiradas por microscopia confocal (Leica Microsystems) com auxílio do software AF6000 e edição em Image J (v. 1.37).

4.10) Quantificação de RNA mensageiro em aortas

Os transcritos de um micrograma de RNA para todos os grupos de camundongos Gal-1^{+/+} (controle e tratados por 24 horas, 7 e 15 dias) foram submetidos a Real Time PCR. As análises da quantificação da mensagem de RNA para amostras de artérias aorta demonstraram haver variações de expressão gênica para Gal-1 para os diferentes tempos de tratamento de hiperhomocisteinemia moderada.

A expressão gênica foi feita de amostras em duplicatas de um pool de 5 artérias, sendo testados dois conjuntos de primers, Lgals-1_M F1 e R1 e, Lgals-1_M F2 e R2, para regiões distintas dentro do gene da Gal-1. Os dados são apresentados na tabela.05 e na figura.18, com a média da expressão de Gal-1 para os dois conjuntos de primers.

Os níveis de expressão relativa da Gal-1, para as amostras de animais tratados e controle, foram feitas em comparação com o nível de expressão para GAPDH (glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase), gene constitutivo, de expressão contínua no tecido analisado, artéria aorta.

Tabela.04. Análise do nível de expressão gênica relativa da Gal-1 (em relação ao gene constitutivo GAPDH) em camundongos Gal-1^{+/+} controle e tratados por 15 dias para modelo de hiperhomocisteinemia moderada.

Conjunto de primers Lgals-1 M F1 e R1				
Amostras	Valor médio de CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Expressão Gênica Relativa tratado 15 dias / controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Controle	22,33	0.355	0	1
HHcy 24 horas	21,70	-0.405	-0.760	1.6935
HHcy 7 dias	20,43	0.275	-0.080	1.0570
HHcy 15 dias	21,70	-0.06	-0.415	1.3333

Conjunto de primers Lgals-1 M F2 e R2				
Amostras	Valor médio de CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Expressão Gênica Relativa tratado 15 dias / controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Controle	22,185	0.21	0	1
HHcy 24 horas	21,710	-0,395	-0.605	1,5210
HHcy 7 dias	20,395	0,24	0.03	0,9794
HHcy 15 dias	21,6	-0,16	-0.37	1,2923

Figura.18. **Expressão média do gene da Gal-1, por Real Time PCR, em aorta de animais tratados com 0,4g/Kg/dia de homocisteína-tiolactona.** Expressão gênica da Gal-1 relativa ao gene da GAPDH.

Gal-1 é descrita como sendo expressa por vários tipos celulares incluindo células endoteliais (BAUM *et al.*, 1995) e musculatura lisa vascular (MOISEEVA *et al.*, 2000) em situações fisiológicas e patológica, como nos processos inflamatórios (RUBINSTEIN *et al.*, 2004; GIL *et al.*, 2006 a e b). Nesse trabalho, a Gal-1 foi detectada em aortas de animais selvagens (Gal-1^{+/+}) controles, sem

tratamento e tratados com Hcy-T_{aq} através de Western blot (figura.16), imunofluorescência por confocal (figura.17) e de expressão gênica por Real time PCR (figura.18)

4.11) RT-PCR

A reação de PCR em amostras de cDNA de camundongos Gal-1^{+/+} controle e tratados com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq} por 24 horas, 7 e 15 dias e animais Gal-1^{-/-} não demonstraram diferença de expressão da iNOS para quaisquer grupos de amostras. (figura.19).

A análise da amplificação das amostras de cDNA dos mesmos grupos revelou haver pequenas diferenças na expressão para eNOS (figura.20). Observa-se um padrão comum de expressão para os grupos controles de aortas de animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}. O mesmo sinal é detectado em artérias de camundongos tratados por 7 dias. No entanto, para artérias de animais Gal-1^{+/+} observa uma pequena diminuição de expressão para eNOS.

Figura.19. **Expressão de iNOS, por PCR em cDNA de artérias de camundongos selvagens ($Gal-1^{+/+}$) tratados ou não com Hcy- T_{aq} e animais destituídos do gene da Gal-1 ($Gal-1^{-/-}$).** C representa anemias controle, sem tratamento. 24h, 7d e 15d representam, respectivamente, animais tratados por 24 horas, 7 e 15 dias.

Figura.20. ***Expressão de eNOS, por PCR em cDNA de artérias de camundongos selvagens (Gal-1^{+/+}) tratados ou não com Hcy-T_{aq} e animais destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1^{-/-}).*** C representa animais controle, sem tratamento. 24h, 7d e 15d representam, respectivamente, animais tratados por 24 horas, 7 e 15 dias. Banda específica com 340pb.

4.12) Detecção de eNOS e iNOS, por imunohistoquímica - peroxidase

Cortes de 10µm de artérias de animais selvagens, Gal-1^{+/+}, tratados com Hcy-T_{aq} foram avaliados quanto ao nível de expressão das óxido nítrico sintases (NOSs) em relação as expressões basais em animais controles, sem tratamento, Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}.

Não foram observadas diferenças no padrão de expressão da óxido nítrico sintase endotelial induzida (iNOS), pois nas artérias de todos os grupos tratados (48 horas, 7 e 15 dias) e do grupo controle (sem tratamento) a iNOS foi detectada e com a mesma intensidade (figura.21).

Porém, a expressão de eNOS teve observada alteração para com o tratamento com Hcy-T_{aq}. Foram detectadas brandas alterações de redução de eNOS para as artérias dos grupos Gal-1^{+/+} tratados por 48 horas e 7 dias (figura.21.), fato esse reiterado por RT-PCR

Para as aortas de animais Gal-1^{+/+} tratados por 15 dias e animais controles (Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-}), sem tratamento, a marcação se mostrou semelhante e homogênea.

Figura.21. **Detecção da expressão das óxido nítrico sintetases endotelial (eNOS) e induzida (iNOS) em aortas de camundongos selvagens (*Gal-1^{+/+}*) tratados ou não com homocisteína-tiolactona e, de animais destituídos do gene para *Gal-1* (*Gal-1^{-/-}*) sem tratamento.** Preparações de artérias derivadas de animais *Gal-1^{+/+}* tratados com 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq} por 48 horas (B, G e L), 7 dias (C, H e M) e 15 dias (D, I e N) foram incubadas com anticorpo anti-eNOS (F, G, H, I e J) ou anti-iNOS (E, F, G e H). Como controle negativo de reação

[AP(-)], foi utilizado BSA 1% no lugar do anticorpo primário (A, B, C, D e E). Todos os cortes foram incubados com segundo anticorpo (anti-IgG de coelho biotinizado). Aumento de 600X.

4.13) Determinação da concentração de nitrato em soro sanguíneo

A determinação de nitrato em soro dos animais selvagens tratados com 0,4g;Kg;dia de Hcy-T_{aq} em diferentes tempos, não demonstrou haver diferenças significativas entre quaisquer grupos de tratamento em relação ao controle (tabela.05).

Tabela.05. Concentração de NO₃ em amostras de soro de camundongos selvagens submetidos ao tratamento de HHcy moderada em diferentes tempos de tratamento.					
Amostras	Controle (H ₂ O)	HHcy 12h	HHcy 24h	HHcy 7dias	HHcy 15 dias
NO ₃ (µM ±SEM)	19.47±1.05	27.65±7.81	23.66±2.46	23.36±3.04	20.48±3.40

Porém, a concentração plasmática basal de nitrato nos camundongos destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1^{-/-}) é relativamente reduzida em comparação aos valores basais dos animais selvagens (figura.22). Ainda, foi demonstrado que o tratamento para HHcy moderada por 15 dias causou uma nova redução dos níveis de NO₃, tanto em relação a concentração basal nos animais Gal-1^{-/-} controles, quanto ao grupo de animais selvagens tratados por 15 dias (figura.22).

Desta forma, a diminuição de NO nos animais Gal-1^{-/-}, tanto no tempo controle como em 15 dias pode estar associada a diminuição de rolamento e adesão de leucócitos a parede de vênulas mesentéricas nos grupos de

tratamento de animais Gal-1^{-/-}, já que NO inibe esses eventos (KUBES *et al.*, 1991).

É relatado que modelos de hiperhomocisteinemia estão associados a aumentos de homocisteína plasmática a diminuição da atividade da eNOS (LENTZ, 2005). Essa correlação foi observada no modelo utilizado no pico de homocisteína plasmática (24 horas), apesar dos valores de NO₃⁻ (indicativo de função da eNOS) não estarem modificados em animais Gal-1^{+/+}.

Figura.22. **Concentração de NO₃ em amostras de soro de camundongos selvagens e destituídos do gene da Gal-1, submetidos ou não ao tratamento de HHcy moderada por 15 dias.** Dosagem indireta de nitrato em soro pela conversão de nitrato em nitrito (através da nitrato redutase) e pela determinação deste por Griess. # representa diferença significativa em relação ao controle (n=5).

Gal-1 é capaz de inibir a geração de NO em macrófagos peritoniais em anemias infectados com *T. cruzi* por dois mecanismos descritos: diminuição da expressão da iNOS e alteração do metabolismo da L-arginina (CORREA *et al.*,

2003). Entretanto, neste trabalho, a expressão de iNOS mostrou-se não alterada com o tratamento com Hcy-T_{aq} tanto em nível protéico, por imunoperoxidase, quanto em nível gênico, por RT-PCR, apesar de ter-se detectado, em picos da expressão de Gal-1, a inibição da eNOS por imunoperoxidase e RT-PCR.

4.14) Estudo de funcionalidade vascular: reatividade

Anéis de 4mm de aortas de animais C57/Bl6 selvagens (Gal-1^{+/+}) e animais C57/Bl6 destituídos de gene da galectina-1 (Gal-1^{-/-}) foram submetidos ao experimento de reatividade vascular, com a finalidade de se avaliar possíveis diferenças na homeostase vascular, quanto a respostas fisiológicas e farmacológicas para estímulos de contração na artéria aorta de animais. Além disso, foi adicionada ao meio 12µg/ml de Gal-1 exógena (em PBS) a fim de avaliar o seu possível efeito no mecanismo de contração.

A escolha da dose de Gal-1 foi baseada em achados da literatura sobre o uso dessa lectina em sistemas *in vivo* (LA *et al.* 2003 e GIL *et al.* 2006 a e b)

Foi utilizada, como droga contrátil, a fenilefrina (Phe), um agonista α -1 adrenérgico de ação direta, que apresenta potente efeito vasoconstritor arterial e venoso.

As artérias foram analisadas quanto ao efeito de contração para Phe, na presença e ausência de Gal-1 exógena. Para tanto, as secções de artérias foram pré-incubadas, ou não, com Gal-1, purificada na concentração final de

12µg/mL, sob tensão de 1g, em aeração e em presença de *Krebs* por trinta minutos. Decorrido esse tempo, foram elaboradas curvas cumulativas concentração-efeito para Phe (figura.23). Não foram conseguidos resultados para aortas com presença mínima de 80% de endotélio, visto que a manipulação das artérias em *Kreb's* já é responsável pela desintegração do tecido. Desta forma, apenas resultados para artérias na ausência de endotélio vascular foram adquiridos.

A análise da figura.23 sugere, em situação basal, que o efeito máximo para Phe é aparentemente maior em anéis de aorta de animais Gal-1^{+/+} em relação aos animais Gal-1^{-/-}. Na pré-incubação com Gal-1 exógena os valores de Emax para Phe apresentaram tendência de aumento em ambos os grupos, entretanto essas observações não apresentaram significância estatística. Por outro lado, foi observado que, em condições basais, anéis de aorta de animais Gal-1^{+/+} tem maior valor de pD2 para Phe em relação a aortas de animais Gal-1^{-/-}. Interessantemente, a pré-incubação com Gal-1 diminuiu o valor de pD2 no grupo Gal-1^{+/+}, enquanto induziu aumento significativo para anéis de aortas de animais Gal-1^{-/-}.

Desta forma, esse conjunto de resultados demonstra que em condição basal e na ausência de endotélio, o valor de pD2 para grupo Gal-1^{+/+} é maior do que o valor no grupo Gal-1^{-/-}, sugerindo, portanto que a maior potência em anéis de aorta de animais Gal-1^{+/+} esteja relacionada com a presença de Gal-1 endógena, participando de forma positiva no efeito de contração em resposta a Phe. Contudo, em condição em que foi adicionada Gal-1 exógena, o pD2 de

aortas do grupo Gal-1^{+/+} foi reduzido, diminuindo a potência de ação da Phe, enquanto que no grupo Gal-1^{-/-} a adição foi positiva, aumento a potência de resposta da Phe no vaso, sem entretanto, modificar, significativamente, os valores de Emáx entre situações experimentais analisadas.

Figura.23. **Análise da reatividade vascular para fenilefrina em aortas, desnudada de endotélio, extraídas de animais selvagens e destituídos do gene da Gal-1, em presença ou não de Gal-1 exógena.** As contrações foram estimuladas com 11 concentrações diferentes de Phe (10^{-10} a 10^{-6} M) agrupando as medidas em duas situações: (A) animais selvagens (Gal-1^{+/+}), com e sem pré-incubação com 12 μg/mL de Gal-1. (B) animais destituídos do gene para a Gal-1 (Gal-1^{-/-}), com e sem pré-incubação com 12 μg/mL de Gal-1. (C) Representação de efeito máximo (Emax) de contração dos grupos analisados. (D) Avaliação da potência da Phe, em termos de EC50 (concentração de Phe que causa 50% do efeito máximo observado). (n=4)

Em outro estudo de reatividade vascular, animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foram submetidos ao tratamento da hiperhomocisteinemia moderada experimental com ingestão de 0,4g/Kg/dia de Hcy-T_{aq} por 15 dias.

A funcionalidade das artérias aortas de animais tratados, ou não, foi avaliada frente ao estímulo contráctil do agosnista α -1 adrenérgico, fenilefrina (Phe) e, para efeito relaxante, a acetilcolina (Ach).

O efeito de Phe nas artérias, tanto de animais Gal-1^{+/+} quanto Gal-1^{-/-}, na presença e ausência de endotélio vascular estão apresentados na figura.24. Resumidamente, na presença de endotélio vascular, houve uma redução significativa do efeito máximo de contração para Phe em ambos os grupos tratados, em comparação aos controles (figura.24.A e C) Ainda, a redução foi

mais acentuada para animais Gal-1^{+/+}. Porém não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos controles e entre os dois grupos tratados (figura.13.A e C). Quanto à potência de contração (pD2) para Phe, artérias do grupo Gal-1^{+/+} tratados por 15 dias com Hcy-T_{aq} mostraram que a dose de Phe necessária para 50% do efeito máximo de contração foi significativamente maior em relação ao grupo selvagem controle, concluindo, portanto, que o tratamento para hiperhomocisteinemia moderada diminuiu tanto o efeito máximo (Emáx) quanto potência (pD2) de ação para Phe enquanto nos animais Gal-1^{-/-} apenas a Emáx foi diminuída (figura.24.C e D).

Os dados de contração para Phe obtidos nesse trabalho estão em desacordo com padrões observados na literatura: enquanto em modelos para camundongos e principalmente para ratos mostram que Emáx para Phe aumenta em animais com hiperhomocisteinemia, tanto com endotélio quanto sem (DAYAL *et al.*, 2001; LENTZ, 2005; MIAO *et al.* 2005), apenas em aortas sem endotélio de camundongos Gal-1^{+/+} tratados com Hcy-T_{aq} houve aumento de Emáx. Nos grupos com endotélio, o tratamento diminuiu Emáx.

Outros resultados mostram que não houve alteração no efeito máximo de contração, para Phe, na comparação entre as artérias de animais do grupo Gal-1^{+/+} tratados por 15 dias, sem e com endotélio (figura.24.A e B, C e E). Houve sim uma redução significativa da Emáx para artérias dos grupos controle Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} sem endotélio em comparação aos mesmos grupos em presença de endotélio vascular (figura.124.A e B, C e E).

Esses dados sugerem que o endotélio vascular é de grande importância para a reatividade de aortas, já que a remoção mecânica do endotélio diminuiu a responsividade da Phe, diminuindo o valor de $E_{máx}$ tanto em animais $Gal^{+/+}$ quanto $Gal-1^{-/-}$ controles, alteração essa que não se aplica aos animais $Gal^{+/+}$ tratados, com e sem endotélio os quais que não apresentaram alteração nos valores de $E_{máx}$. Conclui-se, portanto, que o tratamento com a homocisteína-tiolactona foi capaz de induzir uma lesão vascular.

Quanto à avaliação de potência da Phe (pD2), na ausência de endotélio, observou-se uma redução significativa para artérias de animais $Gal-1^{+/+}$ tratados e de animais $Gal-1^{-/-}$ sem tratamento, em relação as artérias do grupo $Gal-1^{+/+}$ controle (figura.24.F).

Figura.24. **Avaliação dos efeitos da fenilefrina na reatividade vascular de artérias, com e sem endotélio, de animais selvagens e destituídos do gene para Gal-1, tratados ou não com homocisteína-tiolactona.** Representação das curvas concentração-efeito para Phe (10^{-10} a 10^{-5}) para animais selvagens (Gal-1^{+/+}) e destituídos do gene da Gal-1 (Gal-1^{-/-}) na presença de endotélio (A) e ausência (B). Em (C) e (E) são expressos os valores de efeito de contração máxima (Emax) para Phe, respectivamente, na presença e na ausência de endotélio. Em (D) e (F) são demonstrados os valores de potência (pD2) calculados por: [pD2 = -log(EC50)] para as curvas de contrações para Phe, respectivamente, com e sem endotélio.

Ainda foi avaliada a funcionalidade vascular de aortas de camundongos Gal-1^{+/+}, tratados ou não com Hcy-T_{aq} e, de animais Gal-1^{-/-} controle, para os efeitos relaxantes estimulados por acetilcolina (ACh).

Os resultados obtidos não demonstram diferenças significativas para efeito máximo de relaxamento entre quaisquer grupos analisados. Também não

foram observadas diferenças para o valor de pD2 das mesmas amostras (figura.25).

Figura.25. **Avaliação dos efeitos da acetilcolina na reatividade vascular de artérias com endotélio, de animais selvagens e destituídos do gene para Gal-1, tratados ou não com homocisteína-tiolactona.** São apresentados em (A) as curvas concentração-efeito para Ach em artérias de animais selvagens (Gal-1^{+/+}) controle e tratado por 15 dias com Hcy-T_{aq}, além de curva para artérias de animais destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}). Em (B) estão representados os valores de potência [pD2 = -log(EC50)] para os mesmos grupos.

Visto que o tratamento com homocisteína-tiolactona aumentou Emáx em aortas sem endotélio de animais Gal-1^{+/+} (figura.24.E) e que a Gal-1 (12ug/mL) exógena pré-incubada com artérias sem endotélio de animais Gal-1^{+/+} gerou uma tendência de aumento também para Emáx, sugere-se que a Gal-1 esteja participando positivamente no efeito de contração para Phe, já que este trabalho detectou também aumento de expressão de Gal-1 no tempo de 15 dias de tratamento com Hcy-T_{aq}, como descrito posteriormente (expressão analisada por

Real-Time, Western blot e imunofluorescência). Ainda nessa linha, como não houve diferenças para valores de relaxamento via Ach, sugere-se também que a Gal-1 pode estar mais relacionada a eventos diretamente associados à musculatura lisa vascular do que ao endotélio em si.

Interessantemente, os valores de Emax para Phe em aortas de camundongos tanto Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foram inferiores quando estes vasos estavam desnudados do endotélio (figura.24.C e E).

Estes dados estão de acordo com relatos da literatura que ilustram a interação direta da Gal-1 com células da musculatura lisa vascular e a modulação de funções biológicas dessas células (MOISEEVA *et al.*, 2000; MOISEEVA *et al.*, 2003). Nessa linha, foi descrito que camundongos deficientes para o gene da Gal-1 apresentam padrão alterado de regeneração muscular frente a desafios inflamatórios e lesivos (WATT *et al.*, 2004). Ainda, foi descrito, recentemente, que animais deficientes para o gene da Gal-1 apresentam uma menor resposta contrátil da musculatura lisa pulmonar frente a processo inflamatório (CASE *et al.*, 2007). Com base nos presentes achados e nos dados da literatura, sugere-se que a Gal-1, endógena e exógena, pode participar positivamente nos eventos do processo de contração da musculatura lisa vascular frente ao desafio com Phe, em aortas sem endotélio de animais tratados com Hcy-T_{aq} por 15 dias.

Gal-1, ainda, pode modular o estresse oxidativo por induzir a liberação de radicais livres de oxigênio em alguns tipos celulares ativados (ALMKVIST *et al.*, 2002) e promover a inibição da geração de radicais livres de nitrogênio por

bloquear a expressão da NO sintase induzida e promover a geração de radicais livres do oxigênio por modular o metabolismo da L-arginina (CORREA *et al.*, 2003), como descrito para hiperhomocisteinemia (LENTZ, 2005).

4.15) Microscopia intravital

A análise dos experimentos de microscopia intravital indicou que todos os animais selvagens (Gal-1^{+/+}) tratados com Hcy-T_{aq} apresentaram aumento significativo do número leucócitos rolantes na parede endotelial de vênulas mesentéricas em relação ao controle, sem tratamento (figura.26.A). Esse aumento se mostrou gradativo, concentração-efeito para com o tratamento com Hcy-T_{aq}. Já nos animais destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}) foi observado aumento do número de leucócito para os tempos de 24 horas e 15 dias, não havendo alteração para o grupo 7 dias em relação ao controle. (figura.26.A).

Nos resultados apresentados para adesão em camundongos Gal-1^{+/+}, mostrou-se haver aumento significativo de leucócitos aderidos somente em animais tratados por 15 dias. Já nos grupos de camundongos Gal-1^{-/-}, houve aumento significativo nos grupos de tratamento de 7 e 15 dias. (figura.26.B).

É importante ressaltar que o tratamento com Hcy-T_{aq} alterou mais acentuadamente os parâmetros de rolamento e adesão para os camundongos Gal-1^{+/+} do que para animais Gal-1^{-/-}.

Figura.26. **Análise de rolamento e adesão de leucócitos na parede de vênulas mesentéricas de camundongos selvagens ($Gal^{+/+}$) e deficientes do gene para $Gal-1$ ($Gal^{-/-}$), tratados ou não como homocisteína-tiolactona.** Rolamento é expresso por número de leucócitos rolando por minuto numa área de $100\mu m^2$ de leito venular. Adesão é dada por número de células aderidas firmemente ao endotélio da vênula pela mesma área. Foram analisadas 2 vênulas por animal. *** e ### representam diferença significativa com valor de $p < 0,001$ em relação aos grupos controles, respectivamente, $Gal-1^{+/+}$ e $Gal-1^{-/-}$. \$\$\$, $p < 0,001$ entre os grupos relacionados. (n=5)

A análise por microscopia intravital para rolamento e adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas revelou haver um processo inflamatório instalado pela hiperhomocisteinemia moderada experimental, semelhante a dados para roedores em mesmo modelo de lesão endotelial (PRUEFER *et al.*, 1999, FU *et al.*, 2002, KAMATH *et al.*, 2006).

Segundo estes autores o aumento de moléculas de adesão, com P-selectina e ICAM-1, e a diminuição da oferta de óxido nítrico poderiam estar envolvidos no aumento da adesão e migração de leucócitos. Interessantemente, a Gal-1 pode modular a adesão celular positiva ou negativamente em função do microambiente e dos tipos celulares (HUGLES, 2001, LA *et al.*, 2003) e a produção de óxido nítrico em células inflamatórias (CORREA *et al.*, 2003). Assim, a Gal-1 no modelo da hiperhomocisteinemia, por ação direta e ou indireta, pode estar envolvida no controle do rolamento e adesão leucocitária observados, uma vez que foi possível detectar aumento da expressão gênica e protéica de Gal-1 em amostras de aorta de animais tratados com Hcy-T_{aq}.

Foi demonstrado também que há um aumento de células transmigradas do leito vascular para o exterior das vênulas em animais Gal-1^{+/+} tratados por 7 dias e 15 dias (figura.27).

Figura.27. Análise, por microscopia intravital, da adesão e transmigração leucocitárias em vênulas mesentéricas e regiões adjacentes de camundongos selvagens (*Gal-1^{+/+}*) com hiperhomocisteinemia moderada. (A) representa um segmento de vênula de animal tratado por 24 horas, onde somente se observa leucócitos aderidos e/ou rolando (→). (B) demonstra um segmento de vênula de animal tratado por 7 dias, onde está destacada grande presença de leucócitos transmigrados da vênula para tecido (→). Imagens foram adquiridas em objetiva de aumento de 40x.

Na literatura tem sido demonstrado (DIAS-BARUFFI *et al.* 2003 LA *et al.*, 2003, RUBINSTEIN *et al.*, 2004, GIL *et al.* 2006, 2006b e STOWELL *et al.* 2007.), que Gal-1 pode apresentar um papel anti-inflamatório *in vivo* e *in vitro*. O caráter anti-inflamatório dessa lectina pode estar associado a sua atividade de bloqueio de adesão de neutrófilos ao endotélio (LA *et al.*, 2003) e a sua contribuição para a manutenção da homeostase leucocitária por fagocitose (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003) ou apoptose (RUBINSTEIN *et al.*, 2004). Interessantemente, apesar de maior adesão e transmigração leucocitária provocada pela HHcy nas vênulas pós-capilares em tempos de 7 e 15 dias, não foi observado infiltração neutrofílica para a cavidade peritoneal de camundongos tratados por 24 horas com Hcy-T_{aq}, onde há um aumento mais expressivo de Gal-1 entre os grupos de animais Gal-1^{+/+}. Além disso, foi detectado um aumento de granulócitos circulantes em

animais tratados por 15 dias Hcy-T, um período de tratamento onde foi possível detectar também aumento da expressão gênica e protéica da Gal-1, em aortas.

Entretanto, ensaios de microscopia intravital analisados em animais com peritonite aguda provocada pela injeção de IL-1 β , tiveram o rolamento, adesão e migração leucocitária inibidos pela administração de Gal-1 exógena (LA *et al.*, 2003; GIL *et al.*, 2006a). Considerando, que preliminarmente a Gal-1 endógena pode ter sua expressão aumentada (proteína e RNA) no modelo utilizado neste trabalho, essas alterações de resultados podem ser causadas por diferenças nas abordagens experimentais como: 1) o caráter endógeno e exógeno da Gal-1; 2) modelo de inflamação provocados por estímulos diferentes como IL-1 beta e Hcy-T_{aq}.

Alternativamente, a lesão endotelial causada pela homocisteína por ser decorrente também do processo de homocisteinização de proteínas e a formação de espécies reativas de oxigênio resultante da auto-oxidação da homocisteína (JAKUBOWSKI *et al.*, 2000, WANG *et al.*, 2001). Esse processo pode acarretar modificações de vários tipos de moléculas séricas solúveis como albumina, LDL e proteínas membranas de células endoteliais. Este processo pode comprometer biológica e fisicoquimicamente as funções destas moléculas (JAKUBOWSKI *et al.*, 2000). Portanto, na análise por microscopia intravital, a falta de concordância entre os dados aqui descritos e os achados relatos por GIL, 2006a e LA, 2003 pode ser devido aos processos de homocisteinização, ou da Gal-1 e/ou das moléculas alvos para Gal-1 nas superfícies de leucócitos e endotélio.

5. Conclusão

No presente estudo, foi avaliado o perfil de expressão da Gal-1, em nível gênico e protéico, nas artérias aorta de camundongos tratados ou não com Hcy-T_{aq}. Além disso, foi investigado o nível de interferência da administração desta lectina (forma exógena) e/ou do uso de animais destituídos de seu gene (forma endógena) sobre alguns aspectos biológicos da hiperhomocisteinemia moderada experimental. A realização deste trabalho permitiu a elaboração das seguintes conclusões:

- 1) O tratamento de camundongos com 0,4g/kg/dia com Hcy-T_{aq}, por até 15 dias, provocou o aumento de níveis plasmáticos homocisteína compatíveis com o quadro de HHcy moderada;
- 2) As aortas de animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} não tratados com Hcy-T_{aq} e sem endotélio, apresentaram valores de Emáx para Phe semelhantes, na presença ou ausência Gal-1 exógena. Além disso, a pD2 para Phe foi menor nos animais Gal-1^{-/-} em comparação com os Gal-1^{+/+};
- 3) As aortas de animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} não tratados com Hcy-T_{aq} e sem endotélio, apresentaram valores de Emáx para Phe menores do que para as aortas de ambos os grupos animais com endotélio;
- 4) O rolamento e adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares de animais Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foram modificados como o tratamento desses animais Hcy-T_{aq},

- 5) As taxas de expressão da iNOS , em nível protéico e gênico, nas aortas de animais selvagens tratados ou não com Hcy-T_{aq} foram semelhantes; enquanto a expressão protéica e gênica da eNOS foi menor nas aortas de camundongos tratados por 48 horas e 15 dias com Hcy-T_{aq};
- 6) A concentração plasmática de NOx (NO₃⁻ + NO₂⁻) de animais Gal-1^{-/-} foi menor que a detectada no plasma de animais Gal-1^{+/+};
- 7) O tratamento dos animais Gal-1^{+/+} com Hcy-T_{aq} aumentou a expressão de Gal-1 em suas aortas em nível protéico e gênico.

6. *Referências*

AHMAD, N.; GABIUS, H.J.; SABESAN, S.; OSCARSON, S.; BREWER, C.F. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. **Glycobiology**, New York, v. 14, n. 9, p. 817-25, sep. 2004.

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, 15 apr. 2002.

ASHWELL, G.; MORELL, A.G. Membrane glycoproteins and recognition phenomena. **Trends in Biochemical Science**, v. 2, p. 76-78, 1972.

AUSTIN, R.C.; LENTZ, S.R.; WERSTUCK, G.H. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. **Cell death differentiation**, London, v. 11, p. S56-S64, jul. 2004.

BALDINI, A.; GRESS, T.; PATEL, K.; MURESU, R.; CHIARIOTTI, L.; WILLIAMSON, P.; BOYD, Y.; CASCIANO, I.; WELLS, V.; BRUNI, C.B.; MALLUCCI, L.; SINISCALCO, M. Mapping on human and mouse chromosomes of the gene for the beta-galactoside-binding protein, an autocrine-negative growth factor. **Genomics**, San Diego, v. 15, n. 1, p. 216-8, jan. 1993.

BARONDES, S.H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D.N.; CUMMINGS, R.D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M.A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K. et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, Cambridge, v. 76, n. 4, p. 597-8, 25 fev.1994.

BAUM, L.G.; SEILHARMER, J.J.; PANG, M.; LEVINE, W.B.; BEYNON, D.; BERLINER, J.A. Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. **Glycoconjugate journal**, Boston, v. 12, n. 1, p. 63-68, fev. 1995.

BAUM, L.G.; BLACKALL, D.P.; ARIAS-MAGALLAN, S.; NANIGIAN, D.; UH, SY.; BROWNE, J.M.; HOFFMANN, D.; EMMANOULIDES, C.E.; TERRITO, M.C.; BALDWIN, G.C. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. **Clinical immunology**, Orlando, v. 109, n. 3, p. 295-07, dec. 2003.

BIANCO, G.A.; TOSCANO, M.A.; ILARREGUI, J.M.; RABINOVICH, G.A. Impact of protein-glycan interactions in the regulation of autoimmunity and chronic inflammation. **Autoimmunity reviews**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 349-56, may. 2006.

BIRON, V.A.; IGLESIAS, M.M.; TRONCOSO, M.F.; BESIO-MORENO, M.; PATRIGNANI, Z.J.; PIGNATARO, O.P.; WOLFENSTEIN-TODEL, C. Galectin-1: Biphasic growth regulation of Leydig tumor cells. **Glycobiology**, New York, v. 16, n. 9, p. 810-821, set. 2006.

BLASER, C.; KAUFMANN, M.; MULLER, C.; ZIMMERMANN, C.; WELLS, V.; MALLUCCI, L.; PIRCHER, H. β -galactoside binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 28, n. 8, p. 2311–9, aug. 1998.

BOERS, G.H.J.; SMALS, A.G.H.; TRIJBELS, F.J.M. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 313, n. 12, p. 709-715, 19 set. 1985.

BÖGER, R.H. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. **Cardiovascular research**, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 824–33, 1 oct. 2003.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, New York, v. 119, p. 419, 1954.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, New York, v. 9, n. 12, p. 1194-8, dec. 1954.

BRIZZOLARA, A.L.; STEWART-LEE, A.; BURNSTOCK, G. Responses of rabbit basilar arteries to vasoconstrictor and vasodilator agents: the effects of atherosclerosis, age and sex. **Journal of vascular research**, Basel, v. 31, n. 2, p. 106-113, mar-apr. 1994.

BURGESS, W.H.; MACIAG, T. The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 58, p. 575–606, 1989.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, Baltimore, v. 87, n. 10, p. 840–4, 10 nov. 2000.

CAI, H.; GRIENDLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidase as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends in pharmacological sciences**, Barking, v. 24, n. 9, p. 471–8, set. 2003.

CASE, D.; IRWIN, D.; IVESTER, C.; HARRAL, J.; MORRIS, K.; IMAMURA, M.; ROEDERSHEIMER, M.; PATTERSON, A.; CARR, M.; HAGEN, M.; SAAVEDRA, M.; CROSSNO, J.; YOUNG, K.A.; DEMPSEY, E.C.; POIRIER, F.; WEST, J.; MAJKA, S. Mice deficient in galectin-1 exhibit attenuated physiological responses to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, Bethesda, v. 292, n. 1, p. L154-64, jan. 2007.

CHAN, J.; O'DONOGHUE, K.; GAVINA, M.; TORRENTE, Y.; KENNEA, N.; MEHMET, H.; STEWART, H.; WATT, D.J.; MORGAN, J.E.; FISK, N.M. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. **Stem cells**, Dayton, v. 24, n. 8, p. 1879-91, aug. 2006.

CHELLAN, B.; NARAYANI, J.; APPUKUTTAN, P.S. Galectin-1, an endogenous lectin produced by arterial cells, binds lipoprotein(a)[Lp(a)] in situ: Relevance to atherogenesis. **Experimental and molecular pathology**, New York, 3 may. 2007.

CHEN, Z.; KARAPLIS, A.C.; ACKERMAN, S.L.; POGRIBNY, I.P.; MELNYK, S.; LUSSIER-CACAN, S.; CHEN, M.F.; PAI, A.; JOHN, S.W.; SMITH, R.S.; BOTTIGLIERI, T.; BAGLEY, P.; SELHUB, J.; RUDNICKI, M.A.; JAMES, S.J.; ROZEN, R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 433-43, 1 mar. 2001.

CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; FRUNZIO, R.; BRUNI, C.B. Galectin genes: regulation of expression. **Glycoconjugate journal**, Boston, v. 19, n. 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, n. 10, p. 5198-206, 10 mar. 1995.

CHUNG, C.D.; PATEL, V.P.; MORAN, M.; LEWIS, L.A.; MICELI, M.C. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 165, n. 7, p. 3722-9, 1 oct. 2000.

CONN, G.; BAYNE, M. L.; SODERMAN, D.D.; KWOK, P.W.; SULLIVAN, K.A.; PALISI, T.M.; HOPE, D.A.; THOMAS, K.A. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet derived growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 7, p. 2628–2632, apr. 1990.

COOPER DN. BARINDES SH. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, New York, v. 9, n. 10, p. 979-84, oct. 1999.

CORREA, S.; SOTOMAYOR, C.; AOKI, M.; MALDONADO, C.; RABINOVICH, G. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory and activated macrophages. **Glycobiology**, New York, v. 13, n. 2, p. 119–128, fev. 2003.

CRAIG, W.Y.; NEVEUX, L.M.; PALOMAKI, G.E.; CLEVELAND, M.M.; HADDOW, J.E. Lipoprotein(a) as a risk factor for ischemic heart disease: metaanalysis of prospective studies. **Clinical chemistry**, Baltimore, v. 44, n. 11, p. 2301-2306, nov. 1988.

DADZIE, O.; HUJARI, N.M.; BUCKNALL, C.; REDWOOD, S.; RUBENS, M.; GOLDSMITH, D. Inflammation and coronary calcification in renal patients-factor that may explain increased cardiovascular risk, and poorer of coronary interventions? **Journal of nephrology**, Rome, v. 17, n. 1, p. 118-24, jan-fev. 2004.

DANGAS, G.; MEHRAN, R.; HARPEL, P.C.; SHARMA, S.K.; MARCOVINA, S.M.; DUBE, G.; AMBROSE, J.A.; FALLON, J.T. Lipoprotein(a) and inflammation in human coronary atheroma: association with the severity of the clinical presentation. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 32 n. 7, p. 2035-2042, dec. 1998.

DAYAL, S.; BOTTIGLIERI, R.; ARNING, E.; MAEDA, N.; MALINOW, M.R.; SIGMUND, C.D.; HEISTAD, D.D.; FARACI, F.M.; LENTZ, S.R. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. **Circulation research**, Baltimore, v. 88, n. 11, p. 1203-9, 8 jun. 2001.

DAYAL, S.; BROWN, K.L.; WEYDERT, C.J.; OBERLEY, L.W.; ARNING, E.; BOTTIGLIERI, T.; FARACI, F.M.; LENTZ, S.R. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v. 22, n. 12, p. 1996-2002, 1 dec. 2002.

DAYAL, S.; ARNING, E.; BOTTIGLIERI, T.; BÖGER, R.H.; SIGMUND, C.D.; FARACI, F.M.; LENTZ, S.R. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, New York, v. 35, n. 8, p. 1957-62, aug. 2004.

de BREE, A.; VERSCHUREN, W.M.; BLOM, H.J.; KROMHOUT, D. Alcohol consumption and plasma homocysteine: what's brewing? **International journal of epidemiology**, London, v. 30, n. 3, p. 626-627, jun. 2001.

den HEIJER, M.; ROSENDAAL, F.R.; BLOM, H.J.; GERRITS, W.B.; BOS, G.M. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. **Thrombosis and haemostasis**, Schattauer, v. 80, n. 6, p. 874-7, dec. 1998.

den HEIJER, M.; LEWINGTON, S.; CLARKE, R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. **Journal of thrombosis and haemostasis**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 292-9, fev. 2005.

de VALK-DE ROO, G.W.; STEHOUWER, C.D.; LAMBERT, J.; SCHALKWIJK, C.G.; VAN DER MOOREN, M.J.; KLUFT, C.; NETELENBOS, C. Plasma

homocysteine is weakly correlated with plasma endothelin and von Willebrand factor but not with endothelium-dependent vasodilatation in healthy postmenopausal women. **Clinical chemistry**, Baltimore, v. 45, n. 5, p. 1200-5, aug. 1999.

de WAARD, A.; HICKMAN, S.; KORNFIELD, S. Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 251, n. 23, p. 7581-7, 10 dec. 1976.

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; MOON-JAE, C.H.O.; KARMAKAR, S.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1 induction of Adipogenesis in Human leukocytes. **Glycobiology**, New York, abstract, v. 11, n. 10, p. 889, oct. 2001.

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; CHO, M.; KARMAKAR, S. M.C.; EVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without inducing Apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 42, p. 41282-93, 17 oct. 2003.

DODD, R.B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, New York, v. 11, n. 5, p. 71R-9R, may, 2001.

EBERHARDT, R.T.; FORGIONE, MA CAP A, LEOPOLD JA, RUDD MA, TOLLIET M, HEYRICK S, STARK R, KLINGS ES, MOLDOVAN NI, YAGHOUBI M, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, FARBER HW, COHEN R, LOSCALZO J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 106, n. 4, p. 483-91, aug. 2000.

ENDEMANN, D.; SCHIFFRIN, E. Endothelial Dysfunction. **The American Society of Nephrology**, Washington, v.15, n. 8, p.1983-1992, aug. 2004.

ENGLISH, K.M.; JONES, T.H.; MORICE, A.H.; CHANNER, K.S. Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. **Clinical science**, London, v. 99, n. 1, p. 77-82, jul. 2000.

FARACI, F.M. Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v. 23, n. 3, p. 371–3, 1 mar. 2003.

FOLKMAN, J. The role angiogenesis in tumor growth. **Seminars in cancer biology**, London, v. 3, n. 2, p. 65–71, apr. 1992.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other diseases. **Nature medicine**, New York, v. 1, n. 1, p. 27–31, jan. 1995.

FRASCH, S.C.; HENSON, P.M.; KAILEY, J.M.; RICHTER, D.A.; JANES, M.S.; FADOK, V.A.; BRATTON, D.L. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 30, p. 23065-73, 28 jul. 2000.

FRED BREWER, C. Binding and cross-linking properties of galectins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1572, n. 2-3, p. 255-62, 19 sep. 2002.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHII, T.; KIM, H.R.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; KAGAWA, S.; RAZ, A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer research**, Chicago, v. 63, n. 23, p. 8302-11, 1 dec. 2003.

GARÍN, M.I.; CHU, C.C.; GOLSHAYAN, D.; CERNUDA-MOROLLÓN, E.; WAIT, R.; LECHLER, R.I. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. **Blood**, New York, v. 109, n. 5, p. 2058-65, 1 mar. 2007.

GITT, M.A.; BARONDES, S.H. Genomic sequence and organization of two members of a human lectin gene family. **Biochemistry**, Washington v. 30, n. 1, p. 82-9, 8 jan. 1991.

GIUSTI, B.; MARCUCCI, R.; LAPINI, I.; SESTINI, I.; LENTI, M.; YACOUN, M.; PEPE, G. Role of hyperhomocysteinemia in aortic disease. **Cellular and molecular biology**, Noisy-le-grand, v. 50, n. 8, p. 945-52, dec. 2004.

GOYETTE, P.; PAI, A.; MILOS, R.; FROSST, P.; TRAN, P.; CHEN, Z.; CHAN, M.; ROZEN, R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate

reductase (MTHFR). **Mammalian Genome Society**, New York, v. 9, n. 8, p. 652-6, aug. 1998.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, New York, v. 126, n. 1, p. 131–138, oct. 1982.

GUTTORMSEN, A.B.; SCHNEEDE, J.; FISKESTRAND, T.; UELAND, P.M.; REFSUM, H.M. Plasma concentration of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in health human species. **The Journal of nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 10, p. 1934-1941, oct. 1994.

HAJJAR, K.A.; MAURI, L.; JACOVINA, A.T.; ZHONG, F.M.; MIRZA, U.A.; PADOVAN, J.C.; CHAIT, B.T. Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain – direct modulation by homocysteine. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 16, p. 273: 9987–93, 17 apr. 1998.

HANKEY, G.J. Role of lipid-modifying therapy in the prevention of initial and recurrent stroke. **Current opinion in lipidology**, London, v. 13, n. 6, p. 645-651, dec. 2002.

HARKER, L.A.; SLICHTER, S.J.; SCOTT, C.R.; ROSS, R. Homocysteinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 291, n. 11, p. 291: 537–43, 12 set. 1974.

HARKER, L.A.; ROSS, R.; SLICHTER, S.J.; SCOTT, C.R. Homocysteine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 58, n. 3, p. 731–41, sep. 1976.

HARKER LA, HARLAN JM, ROSS R. Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced endothelial injury and arteriosclerosis in baboons. **Circulation research**, Baltimore, v. 53, n. 6, p. 731–9, dec. 1983.

HE, J.; BAUM, L.G. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. **Laboratory Investigation**, New York, v. 86, n. 6, p. 578-90, jun. 2006.

HENNIG, B.; TOBOREK, M.; CADER, A, A.; DECKER, E, A. Nutrition, endothelial cell metabolism, and atherosclerosis. **Critical Reviews in food science and nutrition**, Philadelphia, v.34, p.253-258, jan. 1994.

HERNANDEZ-HERNANDEZ. R.; ARMAS-PADILLA. M.C.; ARMAS-HERNANDEZ. M.J.; VELASCO. M. Hypertension and cardiovascular health in Venezuela and Latin American countries. **Journal human hypertension**, Houndmills, v. 14, n. 1, p. S2-5, apr. 2000.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, New York, v. 3, n. 4, p. 297-304, aug. 1993.

HUDGIN, R.L.; PRICER, W.E.; ASHWELL, G.; STOCKERT, R.J.; MORELL, A.G. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 249, n. 17, p. 5536–5543, 10 sep. 1974.

HUGHES, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.1473, n. 1, p. 172-85, 6 dec. 1999.

ILARREGUI, J.M.; BIANCO, G.A.; TOSCANO, M.A.; RABINOVICH, G.A. The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders. **Annals of the Rheumatic disease**, London, v. 64, p. 96-03, nov. 2005.

IRUELA-ARISPE, M.L.; DVORAK, H.F. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. **Thrombosis and haemostasis**, Schattawer, v. 78, n. 1, p. 672–677, jul. 1997.

ISHIKAWA, A.; IMAIZUMI, T.; YOSHIDA, H.; NISHI, N.; NAKAMURA, T.; HIRASHIMA, M.; SATOH, K. Double-stranded RNA enhances the expression of galectin-9 in vascular endothelial cells. **Immunology and cell biology**, Blackwell, v. 82, n. 4, p. 410-414, aug. 2004.

JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; ROGERS, G.; SELHUB, J.; BOWMAN, B.A.; GUNTER, E.W.; WRIGHT, J.D.; JOHNSON, C.L. Serum total homocysteine concentration in adolescent and adult Americans: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **The American journal of clinical nutrition**. Bethesda, v. 69, n. 3, p. 482-489, mar. 1999.

JAKUBOWSKI, H.; ZHANG, L.; BARDEGUEZ, A.; AVIV, A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. **Circulation research**, Baltimore, v. 87, n. 1, p. 45-51, 7 jul, 2000.

JAKUBOWSKI, H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 34, p. 30425-8, 23 aug. 2002.

JIN, R.; GREENWALD, A.; PETERSON, M.D.; WADDELL, T.K. Human Monocytes Recognize Porcine Endothelium via the Interaction of Galectin 3 and α -GAL. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 177, n. 2, p.1289-95, 15 jul. 2006.

KADOYA, T.; OYANAGI, K.; KAWAKAMI, E.; HASEGAWA, M.; INAGAKI, Y.; SOHMA, Y.; HORIE, H. Oxidized galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience letters**, Amsterdam, v. 380, n. 3, p. 284-8, 3 jun. 2005.

KAMATH, A.F.; CHAUHAN, A.N. KISUCKA, J.; DOLE, V.S.; LOSCALZO, J.; HANDY, D.E.; WAGNER, D.F. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. **Blood**, New York, v. 107, n. 2, p. 591-3, 15 jan. 2006.

KAMI, K.; SENBA, E. Galectin-1 is a novel factor that regulates myotube growth in regenerating skeletal muscles. **Current drugs targets**, Hilversum, v. 6, n. 4, p. 395-405, jun. 2005.

KANG, S.S.; WONG, P.W.; MALINOW, M.R. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annual review of nutrition**, Palo Alto, v. 12, p. 279-284, 1992.

KARLSSON, A. Wheat germ agglutinin induced NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 67, n. 7, p. 3461-8, jul. 1999.

KATO, T.; REN, C.H.; WADA, M.; KAWANAMI, T. Galectin-1 as a potential therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis. **Current drugs targets**, Hilversum, v. 6, n. 4, p. 407-18, jun. 2005.

KAUFMAN, R.J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 110, n. 10, p. 1389–98, nov. 2002.

KEW, M. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. **Lancet**, London, v. 355, n. 9204, p. 591-592, 19 fev. 2000.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1572, n. 2-3, p. 187-97, 19 set. 2002.

KIM, K.; MAYER, E.P.; NACHTIGAL, M. Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1641, n. 1, p. 13-23, 17 jun. 2003.

KOCH, A.E.; HALLORAN, M.M.; HASKEL, C.J.; SHAH, N.R.; POLVERINI, P.J. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule 1. **Nature**, London, v. 376, n. 6540, p. 517–519, 10 aug. 1995.

KRAG, T.O.; BOGDANOVICH, S.; JENSEN, C.J.; FISCHER, M.D.; HANSEN-SCHWARTZ, J.; JAVAZON, E.H.; FLAKE, A.W.; EDVINSSON, L.; KHURANA, T.S. Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 38, p. 13856-60, 21 set. 2004.

KUZKAYA, N.; WEISSMANN, N.; HARRISON, D.G.; DIKALOV, S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 25, p. 22546–54, 20 jun. 2003.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N.; Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 11, p. 4651-5, 1 jun. 1991.

LA, M.; CAO, T.V.; CERCHIARO, G.; CHILTON, K.; HIRABAYASHI, J.; KASSAI, K.; OLIANI, S.M.; CHERNAJOVSKY, Y.; PERRETTI, M. A novel biological activity for Galectin-1: Inhibition of Leukocyte-Endothelial Cell Interaction in Experimental Inflammation. **The American Journal of pathology**, Bethesda, v. 163, n. 4, p. 1505-1515, oct. 2003.

LANDMESSER, U.; DIKALOV, S.; PRICE, S.R.; MCCANN, L.; FUKAI, T.; HOLLAND, S.M.; MITCH, W.E.; HARRISON, D.G. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 111, n. 8, p. 1201-9, apr. 2003.

LASKY, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, New York, v. 258, n. 5084, p. 964-969, 6 nov. 1992.

LAUFS, U.; GERTZ, K.; DIRNAGL, U.; BÖHM, M.; NICKENIG, G.; ENDRES, M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. **Brain research, Amsterdam**, v. 942, n. 1-2, p. 23-30, 28 jun. 2002.

LEE, A.H.; HAPPERFIELD, L.C.; BOBROW, L.G.; MILLIS, R.R. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. **Journal of clinical pathology**, London, v. 50, n. 8, p. 669-673, aug. 1997.

LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glycoconjugate journal**, Boston, v. 19, n. (7-9), p. 433-40, 2004.

LENTZ, S.R.; SADLER, J.E. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 88, n. 6, p. 1906-14, dec. 1991.

LENTZ, S.R.; SADLER, J.E. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. **Blood**, New York, v. 81, n. 3, p. 683–9, 1 fev. 1993.

LENTZ, S.R.; SOBEY, C.G.; PIEGORS, D.J.; BHOPATKAR, M.Y.; FARACI, F.M.; MALINOW, M.R.; HEISTAD, D.D. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 98, n. 1, p. 24–9, 1 jul. 1996.

LENTZ, S.R.; ERGER, R.A.; DAYAL, S.; MAEDA, N.; MALINOW, R.M.; HEISTAD, D.D.; FARACI, F.M. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction in cystathionine β -synthase-deficient mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **Bethesda**, v. 279, n. 3, H970-5, sep. 2000.

LENTZ, S.R.; HAYNES, W.G. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor? **Cleveland Clinic journal of medicine**, Cleveland, v. 71, n. 9, p. 729–34, set, 2004.

LENTZ, S.R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. **Journal of thrombosis and haemostasis**, Oxford, v. 3, n. 8, p. 1646-1654, aug. 2005.

LEVINE, J.; SELA, BEN-AMI.; OSHER, YAMIMA.; BELMAKER, R.H. High homocysteine serum levels in young male schizophrenic and bipolar patients and in an animal model. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 1181-91, set. 2005.

LIM, A.; SENGUPTA, S.; MCCOMB, M.E.; THEBERGE, R.; WILSON, W.G.; COSTELLO, C.E.; JACOBSEN, D.W. In vitro and in vivo interactions of homocysteine with human plasma transthyretin. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 50, p. 49707–13, 12 dec. 2003.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical reviews**, Easton, v. 98, n. 2, p. 637-674, 2 apr. 1998.

LIU, F.T.; PATTERSON, R.J.; WANG, J.L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1572, n. (2-3), p. 263-73, 19 set. 2002.

LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumor progression. **Nature reviews. Cancer**, London, v. 5, n. 1, p. 29-41, jan. 2005.

LIU, F.T. Regulatory roles of galectins in the immune response. **International archives allergy and immunology**, Karger, v. 136, n. 4, p. 385-400, apr. 2005.

LOPEZ-LUCENDO, M.F.; SOLIS, D.; ANDRE, S.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KALTNER, H.; GABIUS, H.J.; ROMERO, A. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **Journal of molecular biology**, London, v. 343, n. 4, p. 957-70, 29 oct. 2004.

LOTAN, R.; BELTONI, P.N.; TRESSLER, R.J.; LOTAN, D.; XU, X.C.; NICOLSON, G.L. Expression of galectin on microvessel endothelial cells and their involvement in tumor cell adhesion. **Glycoconjugate journal**, Boston, v. 11, n. 5, p. 462-468, oct. 1994.

LU, Y.; LOTAN, D.; LOTAN, R. Differential regulation of constitutive and retinoic acid-induced galectin-1 gene transcription in murine embryonal carcinoma and myoblastic cells. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1491, n. 1-3, p. 13-9, 25 apr. 2000.

MAHMOUDI, M.; CURZEN, N.; GALLAGHER, P, J. Atherosclerosis: the role of inflammation and infection. **Histopathology**, Oxford, v.50, n. 5, p.534-546, apr. 2007.

MAJORS, A.K.; SENGUPTA, S.; WILLARD, B.; KINTER, M.T.; PYERITZ, R.E.; JACOBSEN, D.W. Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v. 22, n. 8, p. 1354-9, 1 aug. 2002.

MARTIN, S.; POMBO, I.; PONCET, P.; DAVID, B.; AROCK, M.; BLANK, U. Immunologic stimulation of mast cells leads to the reversible exposure of phosphatidylserine in the absence of apoptosis. **International archives of allergy and immunology**, Basel, v. 123, n. 3, p. 249-58, nov. 2000.

McCULLY, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **The American journal of pathology**, Bethesda, v. 56. n. 1, p. 111-28, jul. 1969.

MEININGER, C.J.; ZETTER, B.R. Mast cells and angiogenesis. **Seminars in cancer biology**, London, v. 3, n. 2, p. 73–79, apr. 1992.

MIAO, C.Y.; VILLENEUVE, N.; BRUNEL-JACQUEMIN, C.; PETIT, C.; GUILLAUMIN, J.P.; GRANSAGNE, D.; BRIANT, C.; VILAINE, J.P.; VANHOUTTE, P.M. Chronic mild hyperhomocysteinemia induced aortic endothelial dysfunction but does not elevate arterial pressure in rats. **Journal of vascular research**, Basel, v. 42, n. 2, p. 148-56, mar-apr. 2005.

MIDORIKAWA, S.; SANADA, H.; HASHIMOTO, S.; WATANABE, T. Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 272, n. 1, p. 182-5, 27 may. 2000.

MIJATOVIC, V.; van der MOOREN, M.J. Menopause, oestrogens, SERM's and cardiovascular health in women. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 5-7, nov. 2000.

MIURA, T.; OHNISHI, Y.; KURUSHIMA, H.; HORIE, H.; KADOYA, T.; NAKABEPPU, Y. Regulation of the neuronal fate by DeltaFosB and its downstream target, galectin-1. **Current drugs targets**, Hilversum, v. 6, n. 4, p. 437-44, jun. 2005.

MOISEEVA, E.P.; JAVED, Q.; SPRING, E.L.; DE BONO, D.P. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. **Cardiovascular research**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 493-502, 14 jan. 2000.

MOISEEVA, E.P.; WILLIAMS, B.; GOODALL, A.H.; SAMANI, N.J. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 310, n. 3, p. 1010-6, 24 oct. 2003a.

MOISEEVA, E.P.; WILLIAMS, B.; SAMANI, N.J. Galectin 1 inhibits incorporation of vitronectin and chondroitin sulfate B into the extracellular matrix of human

vascular smooth muscle cells. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1619, n. 2, p. 125-32, 20 jan. 2003b.

MORBIDELLI, L.; BROGELLI, L.; GRANGER, H.J.; ZICHE, M. Endothelial cell migration is induced by soluble P-selectin. **Life science**, Oxford, v. 62, n.1, p. 7–11, 1998.

MUDD, S.H.; SKOVBY, F.; LEVY, H.L.; PETTIGREW, K.D.; WILCKEN, B.; PYERITZ, R.E.; ANDRIA, G.; BOERS, G.H.J.; BROMBERG, I.L.; CERONE, R.; FOWLER, B.; GROBE, H.; SCHMIDT, H.; SCHWEITZER, L. The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. **American journal of human genetics**, Chicago, v. 37, n. 1, p. 1-31, jan. 1985.

MULLER, G.; BEHRENS, J.; NUSSBAUMER, U.; BOHLEN, P.; BIRCHMEIER, W. Inhibitory action of transforming growth factor b on endothelial cells. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 16, p. 5600–5604, aug. 1987.

MURAI, A.; MIYAHARA, T.; FUJIMOTO, N.; MATSUDA, M.; KAMEYAMA, M. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for coronary heart disease and cerebral infarction. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 199-204, feb. 1986.

NANGIA-MAKKER, P.; HONJO, Y.; SARVIS, R.; AKAHANI, S.; HOGAN, V.; PIENTA, K.J.; RAZ, A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **The American journal of pathology**, Bethesda, v. 156, n. 3, p. 899-908, mar. 2000.

NICKEL, W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. **Traffic**, Copenhagen, v. 6, n. 8, p. 607-14, aug. 2005.

NGUYEN, M.; STUBEL, N.A.; BISCHOFF, J. A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. **Nature**, London, v. 365, n. 6443, p. 267–269, 16 set. 1996.

NOTO, R.; NERI, S.; MOLINO, G.; MELI, S.; NOTO, P.; MAUCERI, B.; CILIO, D.; RAPISARDA, A.; NOTO, Z. Hyperhomocysteinemia in menopausal hypertension: an added risk factor and a dangerous association for organ

damage. **European review for medical and pharmacological sciences**, Rome, v. 6, n. 4, p. 81-7, jul-aug. 2002.

NYGARD, O.; VOLLSET, S.E.; REFSUM, H. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. **JAMA: The journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 274, n. 19, p. 1526-1533, 15 nov. 1995.

OLDENBURG, B.; FIJNHEER, R.; VAN DER GRIEND, R.; VANBERGE-HENEGOUWEN, G.P.; KONINGSBERGER, J.C. Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications? **The American journal of gastroenterology**, New York, v. 95, n. 10, p. 2825-2830, oct. 2000.

OZAKI, K.; INOUE, K.; SATO, H.; IIDA, A.; OHNISHI, Y.; SEKINE, A.; SATO, H.; ODASHIRO, K.; NOBUYOSHI, M.; HORI, M.; NAKAMURA, Y.; TANAKA, T. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. **Nature**, London, v. 429, n. 6987, p. 72-75, 6 may. 2004.

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 immunology**, Baltimore, v. 163, n. 7, p. 3801-11, 1 oct. 1999.

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, n. 5, p. 2331-4, 1 sep. 2000.

PEARSON, J. D. Endothelial cell function and thrombosis. **Baillière's best practice & research. Clinical haematology**, London, v.3, p.329-341, sep. 1990.

PERILLO, N.L.; PACE, K.E.; SEILHAMER, J.J.; BAUM, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, London, v. 378, n. 6558, p. 736-9, 14 dec. 1995.

PERILLO, N.L.; UITTENBOGAART, C.H.; NGUYEN, J.T.; BAUM, L.G. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 185, n. 10, p. 1851-8, 19 may. 1997.

PERILLO, N.L.; MARCUS, M.E.; BAUM, L.G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of molecular medicine**, Berlin, v. 76, n. 6, p. 402-12, may. 1998.

PLUDA JM. Tumor associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. **Seminars in oncology**, New York, v. 24, n. 2, p. 203–218, apr. 1997.

RABINOVICH, G.A.; MODESTI, N.M.; CASTAGNA, L.F.; LANDA, C.A.; RIERA, C.M.; SOTOMAYOR, C.E. Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a β -galactoside-binding lectin. **Journal of biochemistry**, Tokyo, v. 122, n. 2, p. 365–73, aug. 1997.

RABINOVICH, G.A.; IGLESIAS, M.M.; MODESTI, N.M.; CASTAGNA, L.F.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; RIERA, C.M.; SOTOMAYOR, C.E. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 160, n. 10, p. 4831–40. 15 may. 1998.

RABINOVICH, G.A.; DALY, G.; DREJA, H.; TAILOR, H.; RIERA, C.M.; HIRABAYASHI, J.; CHERNAJOVSKY, Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 190, n. 3, p. 385-98, 2 aug. 1999.

RABINOVICH, G.A.; SOTOMAYOR, C.E.; RIERA, C.M.; BIANCO, I.; CORREA, S.G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 30, n. 5, p. 1331-9, may. 2000.

RABINOVICH, G.A.; CUMASHI, A.; BIANCO, G.A.; CIAVARDELLI, D.; IURISCI, I.; D'EGIDIO, M.; PICCOLO, E.; TINARI, N.; NIFANTIEV, N.; IACOBELLI, S. Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. **Glycobiology**, New York, v. 16, n. 3, p. 210-20, mar. 2006.

ROCHARD, P.; GALIEGUE, S.; TINEL, N.; PELERAUX, A.; BORD, A.; JBILO, O.; CASELLAS, P. Expression of the peripheral benzodiazepine receptor triggers thymocyte differentiation. **Gene expression**, Elmsford, v. 12, n. 1, p. 13-27, 2004.

ROGERIO, A.P.; CARDOSO, C.R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M.A.; AFONSO-CARDOSO, S.R.; SILVA, E.V.; KOYAMA, N.S.; BASEI, F.L.; SOARES, E.G.; CALIXTO, J.B.; STOWELL, S.R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L.H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, New York, may. 2007 [No prelo; disponível em: <http://glycob.oxfordjournals.org/cgi/reprint/cwm053v1>].

ROLLAND, P.H.; FRIGGI, A.; BARLATIER, A.; PIQUET, P.; LATRILLE, V.; FAYE, M.M.; GUILLOU, J.; CHARPIOT, P.; BODARD, H.; GHIRINGHELLI, O.; CALAF, R.; LUCCIONI, R.; GARÇON, D. Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig: captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. **Circulation**, Dallas, v. 9, n. 5, p. 1161–74, 15 fev. 1995.

ROSS, R. Atherosclerosis an inflammation disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 2, p. 115-126, 14 jan. 1999.

ROSSI, B.; ESPELI, M.; SCHIFF, C.; GAUTHIER, L. Clustering of Pre-B Cell Integrins Induces Galectin-1-Dependent Pre-B Cell Receptor Relocalization and Activation. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 177, n. 2, p. 796-803, 15 jul. 2006.

RUBINSTEIN, N.; ALVAREZ, M.; ZWIRNER, N.W.; TOSCANO, M.A.; ILARREGUI, J.M.; BRAVO, A.; MORDOH, J.; FAINBOIM, L.; PODHAJECER, O.L.; RABINOVICH, G.A. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: a potential mechanism of tumor-immune privilege. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 5, n. 3, p. 241–251, mar. 2004a.

RUBINSTEIN, N.; OLARREGUI, 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, v. 64, n. 1, p. 1-12, jul. 2004b.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal of immunology**. Baltimore. v. 153, n. 4, p. 1798-807, 15 aug. 1994.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; RUBINSTEIN, N.; MENCARELLI, A.; PALAZZETTI, B.; FERERICI, B.; RABINOVICH, G.A.; MORELLI, A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 124, n. 5, p. 1381–94, may. 2003.

SASS, J.O.; NAKANISHI, T.; SATO, T.; SPERL, W.; SHIMIZU, A. S-homocysteinylation of transthyretin is detected in plasma and serum of humans with different types of hyperhomocysteinemia. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 310, n. 1, p. 242–6, 10 oct. 2003.

SAKAGUCHI, M.; SHINGO, T.; SHIMAZAKI, T.; OKANO, H.J.; SHIWA, M.; ISHIBASHI, S.; OGURO, H.; NINOMIYA, M.; KADOYA, T.; HORIE, H.; SHIBUYA, A.; MIZUSAWA, H.; POIRIER, F.; NAKAUCHI, H.; SAWAMOTO, K.; OKANO, H. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 18, p. 7112–7, 2 may. 2006.

SCHÄFER, T.; ZENTGRAF, H.; ZEHE, C.; BRÜGGER, B.; BERNHAGEN, J.; NICKEL, W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 8, p. 6244–6251, 20 feb. 2004.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual review of nutrition**, Palo Alto, v. 19, p. 217–46, 1999.

SENA, A.A.; PROVAZZI, P.J.; FERNANDES, A.M.; CURY, P.M.; RAHAL, P.; OLIANI, S.M. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 1260–7, oct. 2006.

SENGOELGE, G.; KLETZMAYR, J.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; BOHLE, B.; HORL, W.H.; FODINGER, M.; SUNDER-PLASSMANN, G. TGF-beta1 impairs homocysteine metabolism in human renal cells: possible implications for transplantation. **Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation**, Heidelberg, v. 16, n. 12, p. 843–8, dec. 2003.

SENGUPTA, S.; WEHBE, C.; MAJORS, A.K.; KETTERER, M.E.; DIBELLO, P.M.; JACOBSEN, D.W. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the

formation of homocysteine, homocysteine-cysteine mixed disulfide and cystine in circulation. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 50, p. 46896–904, 14 dec. 2001.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, New York, v. 177, n. 53, p. 949–959, 15 sep. 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Lectin biochemistry. New way of protein maturation. **Nature**, London, v. 323, n. 6085, p. 203-4, 18-24 sep. 1986.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, New York, v. 246, n. 4927, p. 227-34, 13 oct. 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, New York, v. 268, n. 1, p. 82-9, jan. 1993.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, New York, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, nov. 2004.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 5, p. 2753-64, 2 feb. 2007.

SIES, H.; SHAROV, V.S.; KLOTZ, L.O.; BRIVIBA, K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 44, p. 27812–7, 31 oct. 1997.

STAMLER, J.S.; OSBORNE, J.A.; JARAKI, O.; RABBANI, L.E.; MULLINS, M.; SINGEL, D.; LOSCALZO, J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 91, n. 1, p. 308–18, jan. 1993.

STAMPFER, M.J.; MALINOW, M.R. Can lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk? **The New England journal of medicine**, Boston, v. 332, n. 5, p. 328-9, 2 fev. 1995.

STANKEVICIUS, E.; KEVELAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, Lithuania, v.39, n. 4, p. 333-341, jun. 2003.

STILL, R.A.; MCDOWELL, I.F. Clinical implications of plasma homocysteine measurement in cardiovascular disease. **Journal of clinical pathology**, London, v. 51, n. 3, p. 183-188, mar. 1998.

STILLMAN, B.N.; HSU, D.K.; PANG, M.; BREWER, C.F.; JOHNSON, P.; LIU, F.T.; BAUM, L.G. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induced T cell death. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 176, n. 2, p. 778-89, 15 jan. 2006.

STOCKERT, R.J.; MORELL, A.G.; SCHEINBERG, I.H. Mammalian hepatic lectin. **Science**, New York, v. 186, n. 4161, p. 365–366, 25 oct. 1974.

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**, New York, v. 14, n. 2, p. 157-67, fev. 2004.

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, n. 1, p. 219-27, 1 jan. 2007.

STUHLINGER, M.C.; TSAO, P.S.; HER, J.H.; KIMOTO, M.; BALINT, R.F.; COOKE, J.P. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. **Circulation**, Dallas, v. 104, n. 21, p. 2569–75, 20 nov. 2001.

STUHLINGER, M.C.; OKA, R.K.; GRAF, E.E.; SCHMOLZER, I.; UPSON, B.M.; KAPOOR, O.; SZUBA, A.; MALINOW, M.R.; WASCHER, T.C.; PACHINGER, O.; COOKE, J.P. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role

of asymmetric dimethylarginine. **Circulation**, Dallas, v. 108, n. 8, 933–8, 26 aug. 2003.

SWANSON, D.A.; LIU, M.L.; BAKER, P.J.; GARRETT, L.; STITZEL, M.; WU, J.; HARRIS, M.; BANERJEE, R.; SHANE, B.; BRODY, L.C. Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 21, n. 4, p. 1058–65, fev. 2001.

TAHARA, K.; TSUCHIMOTO, D.; TOMINAGA, Y.; ASOH, S.; OHTA, S.; KITAGAWA, M.; HORIE, H.; KADOYA, T.; NAKABEPPU, Y. DeltaFosB, but not FosB, induces delayed apoptosis independent of cell proliferation in the Rat1a embryo cell line. **Cell death differentiation**, London, v. 10, n. 5, p. 496-507, may. 2003.

TEICHBERG, V.I.; SILMAN, I.; BEITSCH, D.D.; RESHEFF, G. A beta-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, v. 72, n. 4, p.1383-87, apr. 1975.

TANAKA, T.; OZAKI, K.; Inflammation as a risk factor for myocardial infarction. **Journal of human genetics**, Tokyo, v. 51, n. 7, p. 595-604, 2006.

THIJSEN, V.L.; POSTEL, R.; BRANDWIJK, R.J.; DINGS, R.P.; NESMELOVA, I.; SATIJN, S.; VERHOFSTAD, N.; NAKABEPPU, Y.; BAUM, L.G.; BAKKERS, J.; MAYO, K.H.; POIRIER, F.; GRIFFIOEN, A.W. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 43, p. 15975-80, 24 oct. 2006.

TOSCANO, M.A.; COMMODARO, A.G.; ILARREGUI, J.M.; BIANCO, G.A.; LIBERMAN, A.; SERRA, H.M.; HIRABAYASHI, J.; RIZZO, L.V.; RABINOVICH, G.A. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 176, n. 10, p. 6323-32, 15 may. 2006.

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 T(H)1, T(H)2 and T(H)-17

effector cells selectively regulated susceptibility to cell death. **Nature immunology**, New York, jun. 2007. [No prelo; disponível em: <http://www.nature.com/ni/journal/vaop/ncurrent/pdf/ni1482.pdf>].

TROEN, A.M.; The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 1140-1151, sep. 2005.

TSIKAS, D.; FROLIC, J.C.; S-nitrosoalbumin plasma levels in health and disease: facts or artifacts? Value of analytical chemistry in nitric oxide clinical research. **Circulation research**, Baltimore, v. 90, n. 3, p. e39, 22 fev. 2002.

UBBINK, J.B. Vitamin nutrition status and homocysteine: An atherogenic risk factor. **Nutrition reviews**, Baltimore, v. 52, n. 11, p. 383-7, nov. 1994.

UNDAS, A.; WILLIAMS, E.B.; BUTENAS, S.; ORFEO, T.; MANN, K.G. Homocysteine inhibits inactivation of Factor Va by activated protein C. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 6, p. 4389–97, 9 feb. 2001.

UPCHURCH, G.R.; WELCH, G.N.; FABIAN, A.J.; FREEDMAN, J.E.; JOHNSON, J.L.; KEANEY, J.F.; LOSCALZO, J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 27, p. 17012–7, 4 jul. 1997.
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, v. 44, n. 4, p. 506-13, jan. 2007.

van der MOOREN, M.J. Cardiovascular protection by postmenopausal hormone replacement therapy – the point of lower estrogen dosages. **Maturitas**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 227-9, 30 may. 2001.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **Essentials of Glycobiology**, 1st Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., Boston. 1999.

VARTANIAN, R.K.; WEIDER, N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density, tumor angiogenesis, and tumor cell proliferation in breast carcinoma. **The American journal of pathology**, Bethesda, v. 144, n. 6, p. 1188–1194, jun. 1994.

VIGNINI, A.; NANETTI, L.; BACCHETTI, T.; FERRETTI, G.; CURATOLA, G.; MAZZANTI, L. Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human aortic endothelial cells: an in vitro study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Springfield, v. 89, n. 9, p.4558-61, sep. 2004.

XAVIER, F.E.; DAVEL, A.P.; ROSSONI, L.V.; VASSALLO, D.V. Time-dependent hyperactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. **Vascular pharmacology**, New York, v. 40, n. 1, p. 67-76, jan. 2003.

YANG, R.Y.; HSU, D.K.; LIU, F.T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 13, p. 6737-42, 25 jun. 1996.

YANG, R.Y.; LIU, F.T. Galectins in cell growth and apoptosis. **Cellular and molecular life sciences**, Birkhauser, v. 60, n. 2, p. 267-76, feb. 2003.

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**, New York, v. 80, n. 8, p. 1233-41, aug. 2000.

WANG, J.L.; GRAY, R.M.; HAUDEK, K.C.; PATTERSON, R.J. Nucleocytoplasmic lectins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1673, n. 1-2, p. 75-93, 6 jul. 2004.

WATANABE, M.; OSADA, J.; ARATANI, Y.; KLUCKMAN, K.; REDDICK, R.; MALINOW, M.R.; MAEDA, N. Mice deficient in cystathionine β -synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 5, p. 1585–9, 28 feb. 1995.

WATT, D.J.; JONES, G.E.; GOLDRING, K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconjugate journal*, Boston, v. 19, n. 7-9, p. 615-9, 2004.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 65, p. 441-73, 1996.

WELCH, G.N.; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 338, n. 15, p. 1042–50, 9 apr. 1998.

WHITNEY, P.L.; POWELL, J.T.; SANFORD, G.L. Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. **The Biochemical journal**, London, v. 238, n. 3, p. 683-9, 15 sep. 1986.

ZHOU, J.; WERSTUCK, G.H.; LHOTÁK, S.; LAWRENCE DE KONING, A.B.; SOOD, S.K.; HOSSAIN, G.S.; MOLLER, J.; RITSKES-HOITINGA, M.; FALK, E.; DAYAL, S.; LENTZ, S.R.; AUSTIN, R.C. Association of Multiple Cellular Stress Pathways With Accelerated Atherosclerosis in Hyperhomocysteinemic Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Circulation**, Dallas, v. 110, n. 2, p. 207-13, 13 jul. 2004.

ZHU, W.; SANO, H.; NAGAI, R.; FUKUHARA, K.; MIYAZAKI, A.; HORIUCHI, S. The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 280, n. 4, p. 1183-8, 2 feb. 2001.