UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da participação da galectina-1 na evolução da infecção
experimental aguda por *Trypanosoma cruzi***

Thalita Bachelli Riul

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da participação da galectina-1 na evolução da infecção
experimental aguda por *Trypanosoma cruzi***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção de
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Thalita Bachelli Riul

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto
2010

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

Riul, Thalita Bachelli

Avaliação da participação da galectina-1 na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*, Ribeirão Preto, 2010.
90p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicada à Farmácia.

Orientador: Dias-Baruffi, Marcelo.

1. Galectina-1. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Infecção. 4. Lectina
5. Imunorregulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Thalita Bachelli Riul

Título do trabalho: Avaliação da participação da glectina-1 na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção de Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

Meus pais, Mara Teresa e Carlos Alberto,

Minha Irmã Nathalia,

Meus avós, tios, tias, primos e primas,

*Podéria passar a vida toda agradecendo o amor, o carinho, a
compreensão, o exemplo e a força que vocês têm me dado
para ter chegado tão longe, mas não seria suficiente.*

Amo vocês, incondicionalmente.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, o respeito, o apoio, a amizade, o carinho e todos os ensinamentos. Sempre para mim um exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa. Sou muito grata por tudo.

À Marlise Bonetti Agostinho Montes

Pela colaboração e apoio na execução deste trabalho. Pela paciência, dedicação e por sempre estar presente nos momentos difíceis. Sou muito grata por todo esse tempo de convívio e amizade.

Aos técnicos e amigos Rubens Eduardo da Silva e Jennifer Michiko Chauca Yokoya

A ajuda e dedicação de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho, colaboração e convívio diários.

Aos amigos do laboratório de Glicoimunobiologia da FCFRP

Natália Sakura Koyama, Karina Alves de Toledo, Camillo Del Cistia Andrade, Lilian Cataldi Rodrigues, Willian Abraham da Silveira, Amanda Cristina Trabuco e Maycon Oliveira, pela ótima convivência, apoio e amizade, fatores fundamentais para mim todos esses anos. Foi ótimo trabalhar com vocês.

À Profa. Dra. Maria Regina Torqueti e às amigas do laboratório de Citologia Clínica

Helen Figueiredo Fumagalli e Bianca Stocco, pelo carinho, amizade, ajuda e incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo convívio e a amizade.

Ao Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses

Carlos Artério Sorgi e Fabiana Rossetto Moraes, pelo valioso auxílio e orientação na realização deste trabalho, assim como as discussões enriquecedoras e o convívio adorável.

Ao Laboratório de Patologia Cardíaca da FMRP

Maria Elena Riul e Cibele Maria Prado, pelo auxílio na realização dos experimentos e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos com os quais trabalhei durante este e outros projetos

Helder Henrique Paiva, Daniel Roberto Callejon, Juliana da Silva Oliveira, Michele Paulo, Mirian Mendonça Salvador, Marcella Daruge Grando, Maicon Petrônio, Eleni José Linjardi e Comissão Organizadora do III SINPOSpq, pela dedicação, conselhos, ajuda, amizade, os quais me fizeram muito feliz, colaboraram com meu crescimento profissional e jamais esquecerei. Muito obrigada pelo carinho.

Aos amigos de graduação e pós-graduação

Marcela de Souza Santos, Rafael de Felício e Mariana Roberto Gama, pela convivência durante esses anos todos, amizade, carinho, força e apoio, sempre. Sou muito grata por ter pessoas como vocês em minha vida.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Pela minha formação tanto na graduação como na pós-graduação, pelos excelentes profissionais e pelo suporte por todos esses anos. Sou muito grata por ter sido aluna.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído

Epígrafe

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”

Jean Cocteau

RESUMO

Riul, T. B. **Avaliação da participação da galectina-1 na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi***. 2010. 90f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A galectina-1 (Gal-1) é uma proteína que reconhece β -galactosídeos e participa de vários processos biológicos, incluindo a modulação da resposta imunológica. Vários relatos da literatura reportam o potencial uso terapêutico da Gal-1 para doenças auto-imunes, inflamatórias, degenerativas e infecciosas. Entretanto, são escassos os relatos sobre o envolvimento da Gal-1 na doença causada por *Trypanosoma cruzi*. O presente trabalho tem como objetivos o estudo da participação da Gal-1 endógena e exógena na evolução da infecção aguda experimental por *T. cruzi*. Galectina-1 recombinante, camundongos C57BL/6 deficientes (nocaute - Gal-1^{-/-}) ou não (selvagem - Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 e macrófagos desses animais foram utilizados em experimentos de infecção *in vivo* e/ou *in vitro*. Os animais foram infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, por via intraperitoneal. Os parâmetros analisados na caracterização do processo de infecção foram: parasitemia e sobrevivência; histopatologia do tecido cardíaco; dosagem de óxido nítrico, pelo método de Griess; imunofenotipagem de leucócitos, por citometria de fluxo; dosagem de citocinas por ELISA e taxa de liberação de parasitas em cultura de macrófagos. Os camundongos Gal-1^{-/-} ou Gal-1^{+/+} tratados com Gal-1 exógena apresentaram as menores taxas de parasitemia. De modo interessante, todos os camundongos Gal-1^{-/-} sobreviveram à infecção, enquanto que os selvagens apresentaram uma drástica redução de sobrevivência após o desafio com *T. cruzi*. A ausência da Gal-1 endógena ou o tratamento com a Gal-1 exógena provocou no músculo cardíaco de camundongos infectados uma significativa redução infiltrado inflamatório. As dosagens de citocinas séricas indicaram que animais selvagens infectados e tratados com Gal-1 apresentaram uma diminuição de IFN- γ em relação aos não tratados. Além disso, soros de animais nocautes infectados apresentaram níveis inferiores de diferentes citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12) em comparação com amostras séricas de animais selvagens infectados. As porcentagens de diferentes tipos de células esplênicas (T, B, macrófagos, NKT e NK) foram, geralmente, maiores em camundongos selvagens do que em nocautes após a infecção por *T. cruzi*. Curiosamente, na cavidade peritoneal de camundongos Gal-1^{-/-} ocorreu um aumento de neutrófilos e macrófagos após 12h ou 24h da infecção, respectivamente. O pico de produção de NO induzido por *T. cruzi* em macrófagos Gal-1^{-/-} foi mais precoce e intenso do que o obtido por macrófagos Gal-1^{+/+}. Além disso, os macrófagos Gal-1^{-/-} liberaram menos parasitas *in vitro* em comparação com os macrófagos Gal-1^{+/+}. Com base nesse conjunto de resultados sugerimos que a ausência de Gal-1 endógena ou o tratamento de animais com Gal-1 exógena promoveram perfis imunológicos (resposta inata e adaptativa) favorecedores da resolução da infecção experimental aguda por *T. cruzi*.

Palavras-chave: Galectina-1, *Trypanosoma cruzi*, infecção, lectina, imunorregulação.

ABSTRACT

Riul, T. B. **Impact of galectin-1 on the evolution of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** 2010. 90f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Galectin-1 (Gal-1) is a β -galactoside-binding protein and participates in several biological processes, including modulation of immune response. In the literature, there are several reports about the potential therapeutic use of Gal-1 for autoimmune diseases, inflammatory, degenerative and infectious diseases. However, there are few reports on the involvement of Gal-1 in disease caused by *Trypanosoma cruzi*. Thus, this work was conducted to study the participation of endogenous and exogenous Gal-1 in acute experimental infection by *T. cruzi*. Recombinant Gal-1, galectin-1-deficient mice (KO - Gal-1^{-/-}) or wild type (WT - Gal-1^{+/+}) mice and macrophages from these animals were used to perform the *in vivo* and *in vitro* assays. The animals were infected with trypomastigotes of *T. cruzi* (strain Y), intraperitoneally. The biological parameters analyzed were parasitemia and survival; histopathology of heart tissue, measurement of nitric oxide by Griess reaction; leukocyte immunophenotyping by flow cytometry; cytokine detection by ELISA and the release rate of parasites in cultured macrophages. Infected-Gal-1^{-/-} mice or infected-Gal-1^{+/+} mice treated with Gal-1 showed the lowest levels of parasitemia. Interestingly, all infected-KO mice survived after the infection, whereas the infected-WT mice showed a drastic reduction in survival. The absence of endogenous Gal-1 or the exogenous Gal-1 treatment promoted a drastic reduction on inflammatory cells infiltrate in the cardiac muscle of infected mice. The sera of infected-WT mice treated with Gal-1, but not untreated animals, showed high levels of IFN- γ . Additionally, sera from infected-KO mice showed lower levels of different cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-12) compared with serum samples from infected-WT animals. The number of spleen cells (T, B cells, macrophages, NK and NKT) were generally higher in WT mice than in KO mice after infection with *T. cruzi*. Interestingly, the peritoneal cavity of infected-KO mice presented an increased numbers of neutrophils and macrophages after 12h or 24h of infection, respectively. The peak of NO production induced by *T. cruzi* in Gal-1^{-/-} macrophages was earlier and more intense than that obtained by Gal-1^{+/+} macrophage. Furthermore, Gal-1^{-/-} macrophage released fewer parasites *in vitro* in comparison to Gal-1^{+/+} macrophages. Taken together, these results suggest that the absence of endogenous Gal-1 or treatment with exogenous Gal-1 promoted immunological profiles (innate and adaptative responses) that cooperate to the resolution of acute experimental infection by *T. cruzi*.

Keywords: Galectin-1, *Trypanosoma cruzi*, infection, lectin, immunoregulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfis cromatográficos referentes à purificação de Gal-1 e à remoção de lactose e 2-ME das preparações de Gal-1.....	25
Figura 2: Análise eletroforética do procedimento de obtenção da Gal-1 ativa e purificada.....	26
Figura 3: O tratamento de animais infectados com Gal-1 exógena reduz o número de <i>T. cruzi</i> circulante no sangue desses animais.....	28
Figura 4: A administração intraperitoneal de Gal-1 em animais infectados por <i>T. cruzi</i> provoca uma redução no número de células do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco desses animais.....	32
Figura 5: Gal-1 exógena inibe a produção sérica de IFN- γ , mas não de TNF- α e IL-12 em animais infectados com <i>T. cruzi</i>	35
Figura 6: Avaliação do número de <i>T. cruzi</i> circulante no sangue de animais infectados e deficientes ou não do gene da galectina-1.....	37
Figura 7: Avaliação da mortalidade de animais infectados com <i>T. cruzi</i>	39
Figura 8: Avaliação morfológica do baço de animais infectados com <i>T. cruzi</i>	41
Figura 9: Avaliação do impacto da Gal-1 endógena na produção de citocinas por animais infectados com <i>T. cruzi</i>	46
Figura 10: Avaliação do envolvimento da Gal-1 endógena no fenótipo de células T esplênicas de animais infectados com <i>T. cruzi</i>	49
Figura 11: Avaliação do envolvimento da Gal-1 endógena no fenótipo de diferentes populações celulares esplênicas de animais infectados com <i>T. cruzi</i>	54
Figura 12: Participação da Gal-1 endógena na produção de NO por células de baço de animais infectados com <i>T. cruzi</i>	61

Figura 13: Animais destituídos do gene da Gal-1 e infectados por <i>T. cruzi</i> apresentam uma redução no número de células do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco.....	63
Figura 14: Participação da Gal-1 endógena no recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção por <i>T. cruzi</i>	65
Figura 15 – Avaliação da participação da Gal-1 endógena na atividade tripanocida de macrófagos infectados com <i>T. cruzi</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME – 2-mercaptoetanol

ANOVA – *Analysis of variance* (Análise de variância entre grupos)

AP-1 – *Activator protein-1* (proteína ativadora-1, fator de transcrição)

Bcl-2 – *B-cell lymphoma-2* (proteína anti-apoptótica)

CD - *Cluster of Differentiation*

Con-A – concanavalina-A

CRD – *Carbohydrate recognition domain* (domínio de reconhecimento de carboidratos)

DNA – *desoxibonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DO – Densidade óptica

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)

ERK-2 – *Extracellular signal-regulated kinase-2* (quinase intracelular)

F4/80 - Marcador de superfície celular para macrófagos

FACS - *Fluorescence-activated cell sorting* (seleção celular ativada por fluorescência)

FITC - *Fluorescein isotiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

FOXP3 – *forkhead box P3* (regulador transcricional de células T regulatórias)

Gal-1 – galectina-1

GPI - glicosilfosfatidilinositol

GR-1- Marcador de superfície celular Ly-6G

H&E - hematoxilina e eosina

IDO - indoleamina-2,3-desoxigenase,

IFN- γ - *Interferon gamma*

IFN- α/β - *Interferon alpha/beta*

IgG - Imunoglobulina G

IL- Interleucina

iNOS - *inducible Nitric Oxide Synthase* (Óxido Nítrico Sintase induzível)

IPTG - isopropil β -D-tiogalacto-piranozideo

J774 – linhagem celular derivada de macrófagos murinos

KO - *knock-out* (animais destituídos do gene da Gal-1)

LLC-MK₂ – linhagem celular derivada de fibroblastos de rim de macaco

LPS – *lipopolissacaride* (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*)

LT - Leucotrieno

mAbs - *monoclonal Antibodies* (anticorpos monoclonais)

Mac-3 – antígeno de superfície de macrófagos murinos

MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MOLT-4 – linhagem celular derivada de leucemia linfoblástica aguda humana

mRNA - *messenger Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico mensageiro)
 NADPH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form* (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida)
 NF-κB - Fator de transcrição
 NK1.1 – antígeno expresso na superfície de células NK e NKT
 NK - *Natural Killer*
 NKT - *Natural Killer T*
 NO - *Nitric Oxide* (óxido nítrico)
 NO_x - *Nitric Oxide x* (óxido nítrico x) = NO₂ e NO₃
 OPD - Ortofenilenodiamino
 PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (células mononucleares periféricas humanas)
 PBS - *Phosphate Buffered Saline* (solução salina-fosfato tamponada)
 PBS-T - solução salina-fosfato tamponada com Tween20 0,05%
 PCR - *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da DNA Polimerase)
 PE - *r-phicoeritrin* (ficoeritrina)
 PerCP - *Peridinin Chlorofil Protein* (proteína peridinina clorofil)
 PG - Prostaglandina
 RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)
 RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* (Meio de cultura celular)
 SAPA - *Shed Acute Phase Antigen* (proteínas de fase aguda secretadas por *T.cruzi*)
 SBF - Soro Bovino Fetal
 SDS-PAGE – *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
 T_H - *T helper*
 TGF-β - *Transforming growth factor-beta*
 TLR – *Toll-like receptor* (receptor do tipo toll)
 TNF-α - *Tumor Necrosis Factor-alpha*
 WT - *wild type* (selvagem)

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de abreviaturas.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A Galectina-1.....	01
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	07
1.3 A galectina-1 e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. METODOLOGIAS.....	14
3.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica.....	14
3.2 Animais de experimentação.....	14
3.3 Cultura e obtenção de tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> <i>in vitro</i>	15
3.4 Obtenção e manutenção de <i>T. cruzi</i> <i>in vivo</i>	15
3.5 Avaliação do impacto da Galectina-1 exógena, na evolução da infecção experimental <i>in vivo</i> por <i>T. cruzi</i>	16
3.5.1 Infecção de camundongos C57BL/6 com <i>T. cruzi</i> e tratamento com Gal-1.....	16
3.5.2 Parasitemia.....	17
3.5.3 Histopatologia e contagem de células do infiltrado inflamatório.....	17
3.5.4 Produção sérica de citocinas em animais infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com Gal-1 exógena.....	18
3.6 Avaliação do impacto da Galectina-1 endógena na evolução da infecção experimental <i>in vivo</i> por <i>T. cruzi</i>	19
3.6.1 Infecção de camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1 ^{-/-}) ou não (Gal-1 ^{+/+}) do gene da galectina-1 com <i>T. cruzi</i>	19
3.6.2 Parasitemia e mortalidade.....	19
3.6.3 Obtenção de células de baço.....	19
3.6.4 Obtenção de sobrenadantes de cultura celular.....	20
3.6.5 Produção sérica de citocinas em animais infectados por <i>T. cruzi</i>	20
3.6.6 Análise fenotípica das populações celulares do baço por citometria de fluxo.....	20
3.6.7 Dosagem de nitritos.....	21

3.6.7 Histopatologia e contagem de células inflamatórias do tecido cardíaco.....	21
3.7 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na resposta inflamatória no sítio de infecção por <i>T. cruzi</i>	22
3.7.1 Avaliação fenotípica de células recrutadas para o sítio de infecção por <i>T. cruzi</i> por citometria de fluxo.....	22
3.8 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na atividade tripanocida de células peritoneais aderentes.....	22
3.8.1 Avaliação da liberação de formas tripomastigotas por células peritoneais aderentes infectadas por <i>T. cruzi</i>	22
3.8.2 Dosagem de nitritos.....	23
3.9 Análise de resultados.....	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica.....	24
4.2 Avaliação do impacto da Galectina-1 exógena, na evolução da infecção experimental <i>in vivo</i> por <i>T. cruzi</i>	27
4.2.1 Parasitemia.....	27
4.2.2 Histopatologia e contagem de células do infiltrado inflamatório.....	30
4.2.3 Produção sérica de citocinas em animais infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com Gal-1 exógena.....	33
4.3 Avaliação do impacto da Galectina-1 endógena na evolução da infecção experimental <i>in vivo</i> por <i>T. cruzi</i>	36
4.3.1 Parasitemia e mortalidade.....	36
4.3.2 Análise morfológica de baço dos animais infectados por <i>T. cruzi</i> deficientes ou não do gene da galectina-1.....	40
4.3.3 Produção sérica de citocinas em animais infectados por <i>T. cruzi</i>	42
4.3.4 Análise fenotípica das populações celulares do baço por citometria de fluxo.....	47
4.3.5 Dosagem de nitritos.....	58
4.3.6 Histopatologia e contagem de células inflamatórias do tecido cardíaco.....	62
4.4 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na resposta inflamatória no sítio de infecção por <i>T. cruzi</i>	64
4.4.1 Avaliação fenotípica de células recrutadas para o sítio de infecção por <i>T. cruzi</i> por citometria de fluxo.....	64

4.5 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na atividade tripanocida de células peritoneais aderentes.....	67
4.5.1 Avaliação da liberação de formas tripomastigotas e produção de óxido nítrico por células peritoneais aderentes infectadas com <i>T. cruzi</i>	67
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS	72

1. Introdução

1.1 Galectina-1: uma lectina de animal multifuncional

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

Essas proteínas ligantes de glicanas participam de diversos processos biológicos e/ou patológicos e podem ser expressas por vários organismos como animais, plantas, fungos, bactérias e vírus (KILPATRICK, 2002, SHARON & LIS, 2004). As lectinas, incluindo as de origem animal, são classificadas com base na sequência de aminoácidos e na homologia estrutural de seus CRDs. Portanto, as proteínas ligantes de glicanas de animais são agrupadas em diferentes famílias identificadas como tipo-C (Cálcio dependente), Galectinas (tipo-S), tipo-I, tipo-M, tipo-L, tipo-P, tipo-R e outras. Além disso, existe uma classe de lectinas que reconhecem glicosaminoglicanos (Tipo-GAG). GAG são polissacarídeos composto por unidades repetitivas de dissacarídeo linear, como hexosamina e hexose ou ácido hexurônico, associados a cadeias laterais de proteínas (proteoglicanos) ou são complexos de polisacarídeos livres (DRICKAMER 1988, KILPATRICK 2002, VARKI *et al.*, 2009).

A família das galectinas foi inicialmente classificada como tipo-S (dependente de grupos sulfidrílicos) para denotar a presença de cisteínas livres nessas moléculas e a dependência de suas solubilidades e atividades lectínicas da manutenção de seus grupos sulfidrílicos na forma reduzida (BARONDES *et al.*, 1994; CUMMINGS & LIU, 2009). As galectinas são proteínas solúveis, não possuem peptídeo sinal, estão confinadas a compartimentos citosólicos e são liberadas para o meio extracelular através de um mecanismo secretório não convencional (COOPER & BARONDES, 1990; SATO *et al.*, 1993, LIU & RABINOVICH, 2010). Essas proteínas que reconhecem β -galactosídeos que contêm preferencialmente seqüências de N-acetilactosaminas, sendo os resíduos terminais β -galactose e o tamanho da cadeia

de polilactosamina requerimentos críticos para a capacidade de reconhecimento de carboidratos dessas lectinas (STOWELL *et al.*, 2004). Até o momento foram descritas 15 galectinas em mamíferos e essa família de proteínas é subdividida em 3 categorias com base na homologia de suas sequências de aminoácidos: I) *prototypical*, são aquelas que contem um único CRD e formam homodímeros não-covalentes; II) *Chimeric*, apresentam um CRD e um domínio amino-terminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina; o qual é sensível a metaloproteinases e contribui para a oligomerização dessas lectinas; III) *Tandem-Repeat*, polipeptídeos únicos compostos por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo ligador de 5 a 50 resíduos de aminoácidos (CUMMINGS & LIU, 2009 – vide diagrama).

Prototypical

Galectinas:
1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15

Chimeric

Galectina-3

Tandem Repeat

Galectinas:
4, 6, 8, 9 e 12

Tipos diferentes de galectinas de mamíferos. As galectinas são classificadas em 3 grupos de acordo com suas características estruturais: *prototypical*, *chimeric* e *tandem repeat*. Os domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) das galectinas apresentam aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos, sendo que apenas alguns desses resíduos interagem diretamente com os carboidratos. Os CRDs das galectinas estão indicados por formas elípticas coloridas, o domínio N-terminal da galectina-3 está ilustrado pela cor vermelha e o peptídeo ligador das galectinas “Tandem Repeat” pela cor laranja. Adaptado de Cummings & Liu, 2009.

As galectinas são expressas por uma grande variedade de tipos celulares e podem participar de interações célula-célula e célula-matriz extracelular e modular funções celulares (CAMBY *et al.*, 2006; CUMMINGS & LIU, 2009). De modo interessante, no espaço extracelular, a interação dessas lectinas com glicanas das superfícies de células do sistema imunológico pode promover a modulação da produção de citocinas e mediadores, adesão celular, apoptose, quimiotaxia e endocitose (CUMMINGS & LIU, 2009; LIU & RABINOVICH, 2010). Já num ambiente intracelular, as galectinas podem participar de vias de sinalização e modular algumas respostas biológicas, como apoptose, diferenciação e migração celulares (CUMMINGS & LIU, 2009; LIU & RABINOVICH, 2010). Assim, essas proteínas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resposta inflamatória, doenças autoimunes, aterosclerose, processos infecciosos e câncer (CUMMINGS & LIU, 2009; LIU & RABINOVICH, 2010). Na literatura, vários achados reportam o potencial uso terapêutico de galectinas recombinantes, ou inibidores específicos dessas proteínas, para diferenças tipos de doenças (CAMBY *et al.*, 2006; CUMMINGS & LIU, 2009; VARKI, 2009; LIU & RABINOVICH, 2010).

A galectina-1 é uma proteína ácida, possui N-terminal acetilado, não possui peptídeo sinal e apresenta resíduos de cisteínas livres. Essa lectina apresenta uma topologia molecular do tipo *jelly-roll* composto por duas folhas- β anti-paralelas. Os monômeros de galectina-1 possuem massa molecular aparente de ~15 kDa, associam-se por meio de interações não covalentes e formam homodímeros com constante de associação de 7 μ M (BARONDES *et al.*, 1994a; CHO & CUMMINGS, 1995; COOPER & BARONDES, 1999; RUBISTEIN *et al.*, 2004; LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004; CAMBY *et al.*, 2006).

A galectina-1 humana é codificada pelo gene LSGALS1, de 4397 pares localizado no cromossomo 22 região q12 (CHIARIOTTI *et al.*, 2004). O transcrito de 0,6kb resulta do *splicing* de 4 éxons e codifica uma proteína de 135 aminoácidos (CHIARIOTTI *et al.*, 2004). A galectina-1 de camundongo é codificada pelo gene *lsgals1*, de 3451 pares de base localizado no cromossomo 15 na região 44.9cM na citobanda E, dando origem um transcrito de 817 pares de base, traduzido a uma proteína de 135 aminoácidos (LOHR *et al.*, 2007). Possui ainda caráter ácido, associa-se de modo reversível formando homodímeros com constante de dissociação de 7 μ M (CHO & CUMMINGS, 1995), e cada monômero possui um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) idênticos (BARONDES *et al.*, 1994b). Essa lectina está presente tanto no meio extracelular como no meio

intracelular, é expressa diferentemente por diversos tecidos, tanto normais como patológicos, e participa de vários processos biológicos. Dentre estes processos podemos citar controle da adesão celular, sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, apoptose, gênese de tumores, fagocitose, processos alérgicos, interações patógeno-hospedeiro e morte de microorganismos, homeostase de célula T, diferenciação hematopoiética, embriogênese e ciclo menstrual (PERILLO *et al.*, 1995; RABINOVITCH *et al.*, 1997; RABINOVITCH *et al.*, 1998; RABINOVITCH *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2002; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LEFFLER *et al.*, 2004; LIU & RABINOVICH, 2010; STOWELL *et al.*, 2010).

A expressão de galectina-1 foi observada em células epiteliais do timo (BAUM *et al.*, 1995), células T primadas com antígeno (BLASER *et al.*, 1998), macrófagos ativados (RABINOVICH *et al.*, 1996), células B ativadas (ZUNIGA *et al.*, 2001b), células endoteliais (LA *et al.*, 2003), e células do estroma e órgãos linfóides murinos como o timo e linfonodo (CHIARIOTTI *et al.*, 1999; RABINOVICH *et al.*, 2002).

Foram descritos alguns receptores de galectina-1 em células T, incluindo CD43, CD45 e CD7 (PACE *et al.*, 1999), fato evidenciado pela redistribuição dessas glicoproteínas em microdomínios específicos após a incubação com galectina-1. Entretanto, o possível envolvimento de CD45 na indução de apoptose por galectina-1 ainda é controverso (NGUYEN *et al.*, 2001; FAJKA-BOJA *et al.*, 2002). A ligação de galectina-1 a células T inicia uma variedade de eventos de transdução de sinal, tais como ERK-2, fosforilação, influxo de cálcio, ativação de fatores de transcrição como AP-1 e redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2, importante para a fisiologia e sobrevivência de célula T (VESPA *et al.*, 1999; RABINOVICH *et al.*, 2000a).

Diversos trabalhos mostram a participação de galectina-1 na resposta imune inata e no processo inflamatório. Nesse contexto, foi mostrado que essa lectina inibe o edema, o extravasamento de neutrófilos e a desgranulação de mastócitos (RABINOVICH *et al.*, 2000b), sendo a migração de neutrófilos na peritonite murina também inibida por galectina-1 (LA *et al.*, 2003). Mostrou-se também que a galectina-1 inibe a liberação de ácido araquidônico (RABINOVICH *et al.*, 2000b), a produção de NO e a expressão de NO sintetase induzida (iNOS) em macrófagos estimulados com LPS (CORREA *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que essa lectina bloqueia a produção de IL-12 em células infectadas por *Trypanosoma cruzi* (ZUNIGA *et al.*, 2001a) e inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células T (RABINOVICH *et al.*, 1999a). Ainda nessa linha, mostrou-se que galectina-1 reduz

a produção de IFN- γ e aumenta os níveis de IL-10 tanto em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) como em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, ambas estimuladas com anti-CD3 ou na ausência deste estímulo. Portanto, essa lectina tem um papel imunorregulador (VAN DER LEIJ *et al.*, 2004; VAN DER LEIJ *et al.*, 2007) e isto, provavelmente estaria correlacionado com o efeito benéfico do tratamento com galectina-1 em modelos de doenças autoimunes experimentais (TOSCANO *et al.*, 2006).

Dados da literatura mostram ainda que Gal-1 pode induzir apoptose em leucócitos (PERILLO *et al.* 1995), dentre os quais estão os timócitos imaturos (PERILLO *et al.*, 1997) e células T ativadas *in vitro* (PERILLO *et al.*, 1995). Entretanto, existem relatos na literatura contrários ao potencial apoptótico da galectina-1. Nessa linha, foi mostrado que apesar de galectina-1 induzir a exposição de fosfatidilserina na superfície de células MOLT-4, estas não entram em apoptose, pois não foi detectada a fragmentação do DNA e a perda da capacidade proliferativa dessas células após tratamento com galectina-1 (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2004; STOWELL *et al.*, 2007). Dessa forma, apesar do papel de galectina-1 na indução de apoptose não estar claro, demonstrou-se que essa lectina está envolvida na homeostase leucocitária por induzir a fagocitose dessas células (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2007). Além disso, a Gal-1 pode promover a apoptose de células T produtoras de citocina pró-inflamatória IL-17 (T_H17) e não de células T_H2 produtoras de IL-10 e TGF- β (citocinas com caráter anti-inflamatório) por meio de reconhecimento diferencial de glicanas na superfícies dessas células, ou seja, essa susceptibilidade está associada ao padrão de glicosilação da superfície dessas células (TOSCANO *et al.*, 2007). De modo interessante, células associadas a linfomas de Hodgkin, podem promover o escape da resposta imunológica antitumoral desses linfomas, por expressar grandes quantidades de Gal-1 (JUSZCZYNSKI *et al.*, 2007). Segundo esses autores, a Gal-1 está envolvida neste processo de escape imunológico por favorecer a secreção de citocinas T_H2 (MOTRAN *et al.*, 2008) e a expansão de células T regulatórias do tipo CD4⁺, CD25⁺(*high*) e FOXP3⁺.

Recentemente, foi relatado que células T regulatórias expressam constitutivamente galectina-1 e que essa lectina tem papel na função supressora destas células, uma vez que células T regulatórias humanas (CD4⁺CD25⁺) não inibiram a proliferação de células T CD4⁺CD25⁻ *in vitro* na presença de anticorpo

anti-galectina-1. Ainda, células CD4+CD25+ provenientes de animais deficientes do gene da Gal-1 ou que células T CD4+CD25+ destituídas do RNA mensageiro para essa lectina apresentaram menores atividades regulatórias em comparação a células provenientes de animais selvagens (GARIN *et al.*, 2007).

O papel da administração de galectina-1 *in vivo* tem sido amplamente estudado. Os pesquisadores têm sugerido que a Gal-1 é um novo alvo molecular promissor para o desenvolvimento de tratamentos terapêuticos novos e originais (CAMBY *et al.*, 2006). Nessa linha, a administração *in vivo* da Gal-1 tem sido usada com sucesso na prevenção da instalação da inflamação crônica em modelos experimentais de encefalomielite autoimune (OFFNER *et al.*, 1990), colite (SANTUCCI *et al.*, 2003); pancreatite crônica (WANG *et al.*, 2000) e artrite reumatóide, onde a administração de galectina-1 aboliu a resposta autoimune sendo que, neste último, o efeito terapêutico foi acompanhado por mudança de resposta de citocinas para padrão T_H2 (RABINOVICH *et al.*, 1999b). A redução na produção de IFN- γ também foi observada em modelo de hepatite induzida por concanavalina A (Con-A) (SANTUCCI *et al.*, 2000), uveíte autoimune experimental (TOSCANO *et al.*, 2006) e reação de enxerto *versus* hospedeiro (BAUM *et al.*, 2003). Também foi descrito que Galectina-1 recombinante humana (Galectina-1 RH) preveniu encefalomielite experimental em camundongos e que injeções de galectina-1 RH ou fibroblastos transfectados secretando Gal-1 regrediram as manifestações clínicas e histopatológicas de artrite induzida pelo colágeno também em camundongos. Nesta mesma linha, o tratamento com esta lectina suprimiu efeitos de colite experimental murina, e a inflamação aguda produzida por veneno de abelha (fosfolipase A2) injetada nas patas de camundongos. Ainda consistente com esses dados, camundongos deficientes de galectina-1 produzem mais IFN- γ e IL-17 em modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) (TOSCANO *et al.*, 2007). Recentemente, Blois *et al.*, 2007, demonstraram que em um modelo experimental de perda fetal induzida por estresse, as fêmeas depletadas de Gal-1 apresentam uma perda fetal elevada em relação às fêmeas normais e, que o tratamento destes animais com Gal-1 recombinante reduziu significativamente a perda fetal.

Portanto, esses estudos realizados em vários modelos experimentais têm estabelecido que a Gal-1 tem atividade antiinflamatória e imunorregulatória (LIU, 2005; BLOIS *et al.*, 2007; TOSCANO *et al.*, 2007), sendo essa modulação da resposta imune relacionada ao efeito benéfico do uso de galectina-1 no tratamento

de diversas doenças autoimunes/inflamatórias experimentais (TOSCANO *et al.*, 2006; CAMBY *et al.*, 2006; LIU & RABINOVICH, 2010).

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

Os parasitas dos gêneros *Trypanosoma* são protozoários da ordem Kinetoplastida (HERWALDT, 1999) pertencentes ainda à família Trypanosomatidae, cuja principal característica é a presença de flagelo e de uma mitocôndria modificada denominada cinetoplasto. Dentre as diversas espécies de *Trypanosoma*, o *Trypanosoma cruzi*, transmitido pela picada de determinados triatomíneos é causador da Doença de Chagas no continente americano (PERLETH, 1997; BARRETT *et al.*, 2003). Esta doença descrita por Carlos Chagas (1909) também é conhecida como tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi* ou tripanossomíase americana (terminologia adotada pela Nomenclatura Internacional de Doenças, NID). Estima-se que aproximadamente 16-18 milhões de pessoas na América do Sul estão infectadas por *T. cruzi*, parasita causador da doença de Chagas, e outros 90 milhões correm risco de serem infectadas. No Brasil, a prevalência é de aproximadamente 4%, o que corresponde cerca de seis milhões de pessoas (MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006).

O *T. cruzi* poderia ser classificado seguindo critérios morfológicos e de tropismo celular. Assim, as cepas finas, como Cepa Y, seriam reticulotrópicas, por seu tropismo preferencial por células hematopoiéticas e fibroblastos e as cepas largas, como Cepa CL, Brazil, Tulahuen e Colombiana são consideradas miotrópicas, por seu tropismo preferencial por células musculares cardíacas e esqueléticas (BRENER & CHIARI, 1963; MELO & BRENER, 1978; ANDRADE *et al.*, 1985). Os critérios morfológicos/tropismo para as distinções dessas cepas também correlaciona com a presença de marcadores moleculares que as distinguem, presentes no cinetoplasto do parasita (MOREL *et al.*, 1980). Embora esses critérios sejam relevantes para o curso da infecção, virulência e manifestação da imunopatologia, com a evolução da doença, ambas, infectariam células de nichos semelhantes, como linfonodos, baço, músculos e trato-gastrointestinal (GUARNER *et al.*, 2001).

O ciclo de vida deste parasita é caracterizado pela presença de diferentes formas encontradas em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. A forma epimastigota, encontrada no interior do vetor barbeiro (insetos da família

Reduviidae, das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*), multiplica-se por divisão binária e diferencia-se na forma tripomastigota metacíclica. Esta é eliminada junto com as fezes e urina sobre a pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sangüíneo, podendo penetrar através do local da picada ou mucosas e invadir células nucleadas. No interior destas células, ela diferencia-se na forma amastigota, a qual se replica por fissão binária. Após alguns ciclos de multiplicação, elas se diferenciam em tripomastigotas sangüíneas, as células são rompidas e os parasitas são liberados para o meio extracelular ou a corrente sangüínea, podendo assim migrar e invadir novas células do hospedeiro ou serem sugados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo do parasita (BRENER, 1973).

Clinicamente, a doença de Chagas pode ser dividida em duas fases, a aguda e a crônica, sendo que o coração e o trato digestivo são os mais afetados pela doença. Na fase aguda, que muitas vezes é subclínica, os parasitas presentes na corrente sangüínea se espalham amplamente pelo organismo do hospedeiro através da replicação dentro de uma variedade de células nucleadas. A progressão da forma aguda para a crônica coincide com a eliminação dos parasitas da corrente sangüínea. Este período é chamado de fase indeterminada, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas significantes. O diagnóstico da doença nesta fase é possível através do exame sorológico para detecção de anticorpos específicos para o parasito da classe IgM (fase aguda) e IgG (fase indeterminada e crônica) (UMEZAWA *et al.*, 2004). A fase indeterminada pode persistir por toda a vida do indivíduo e é nela que se encontra o maior número de pessoas infectadas (70-85%) (SANTOS-BUCH, 1979; PRATA, 2001; BARRETT *et al.*, 2003). Entretanto, cerca de 30% desses indivíduos apresentam alguma das formas crônicas da doença após o intervalo de 10 a 20 anos (RIBEIRO & ROCHA, 1998).

A miocardite aguda é um processo inflamatório no tecido cardíaco que é parte essencial da resposta protetora do hospedeiro contra a infecção (BRENER & GAZZINELLI, 1997). Em biopsias do coração, foi verificado que a fase aguda apresenta alterações histopatológicas, que, incluem a presença de intenso infiltrado inflamatório predominantemente de células mononucleares, presença de ninhos (contendo formas amastigotas) e menos frequentemente pequenas áreas de necrose focal do miocárdio. Em menos de 1-5% dos casos, os pacientes podem manifestar problemas neurológicos e/ou complicações cardíacas graves que às

vezes podem levá-los a óbito (ANSELMÍ & MOLEIRO, 1972; ANDRADE, 1985; PRATA, 2001).

Entretanto, em cerca de 25% casos o processo inflamatório se torna progressivo, resultando na miocardite crônica, sendo que os mecanismos que desencadeiam tal resposta ainda são motivos de controvérsia. Essa fase é caracterizada pela ausência de parasitas circulantes, presença ou ausência de formas amastigotas nos tecidos, presença de inflamação e lesão tissular em determinados órgãos infectados como coração ou trato digestivo, levando a manifestações clínicas polarizadas. Assim, a forma cardíaca é caracterizada por disfunções como: arritmias, miocardite não degenerativa, cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita (ANSELMÍ & MOLEIRO, 1972; ANDRADE, 1985; TANOWITZ *et al.*, 1992); e a forma digestiva é caracterizada por apresentar um aumento de no tamanho do esôfago (megaesôfago) e/ou cólon (megacólon) (EARLAM, 1972; ADAD *et al.*, 1991). É certo, porém, que a reação inflamatória depende de linfócitos T sensibilizados, tendo em vista que em camundongos atímicos infectados por *T. cruzi* não há resposta inflamatória no miocárdio, a despeito de um intenso parasitismo tecidual (GONÇALVES-DA-COSTA *et al.*, 1984). Baseado nestas observações sugere-se que a miocardite na fase aguda seja totalmente dependente de linfócitos T sensibilizados contra antígenos de *T. cruzi* (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 1985). O processo inflamatório gerado após a infecção por *T. cruzi*, ou miocardite, é caracterizado por um infiltrado de células mononucleares, destruição das fibras miocárdicas e acúmulo de fibras de colágeno ao redor dos miócitos (ANDRADE, 1985; TANOWITZ *et al.*, 1992; TALVANI *et al.*, 2000; ROSSI, 1991). Esse infiltrado mononuclear crônico é constituído principalmente de linfócitos T (95%), predominantemente células T CD8⁺, e poucos macrófagos (HIGUCHI *et al.*, 1993; DOS SANTOS *et al.*, 2001). Além disso, é importante ressaltar a aparente ausência de parasitas nas lesões.

O modelo de infecção em camundongos tem sido utilizado para o estudo da doença de Chagas e um estudo inicial demonstrou que a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção é determinada pelos estágios iniciais da infecção, antes do desenvolvimento da imunidade adquirida (TRISCHMANN, 1986).

O mecanismo preciso de ativação do sistema imune inato ainda é controverso. Sabe-se que muitas moléculas provenientes de tripomastigotas, incluindo âncoras de glicosilfosfatidilinositol (âncoras de GPI) (ALMEIDA &

GAZZINELLI, 2001) e DNA (SHODA *et al.*, 2001), são capazes de estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos do hospedeiro. Especificamente, as âncoras de GPI são moléculas abundantes na membrana de tripomastigotas que têm a capacidade de induzir a síntese das citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- α em macrófagos murinos através da ativação de receptores do tipo toll (TLR)-2 (CAMPOS *et al.*, 2001; CAMARGO *et al.*, 1997), promovendo a resistência do hospedeiro durante a infecção inicial com este parasita (CAMPOS *et al.*, 2001).

As citocinas IL-12 e TNF- α produzidas em resposta a infecção induzem a síntese de interferon (IFN)- γ por células natural killer (NK) (GAZZINELLI *et al.*, 1993), e a importância da síntese de IFN- γ por células NK durante a fase aguda da doença de Chagas foi demonstrada tanto pela neutralização de IL-12 e IFN- γ como pela depleção de células NK em camundongos, que os tornou mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi*. Tal resistência está associada à capacidade das citocinas IFN- γ e TNF- α em induzir a atividade tripanocida dos macrófagos (DRAPIER *et al.*, 1988) mediada por óxido nítrico (NO) (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994), que é uma molécula microbicida crucial na resistência a infecção por *T. cruzi* (HOLSCHER *et al.*, 1998).

Além disso, tem sido mostrado que as citocinas IL-12 e IFN- γ induzem a diferenciação de células T CD4⁺ para o padrão Th1, as quais têm papel múltiplo na resistência a *T. cruzi*, dentre os quais destacam-se a produção de IL-2 e IFN- γ e a ativação de macrófagos. É possível que os linfócitos T CD4⁺ atuem principalmente no sentido de atrair outras células (certamente via citocinas e/ou quimiocinas) para o sítio inflamatório, as quais poderiam, via mecanismos líticos, acabar lesando fibras cardíacas. Apesar dos efeitos benéficos desta resposta imune do padrão Th1, ela também pode causar uma forte reação inflamatória através da intensa ativação do compartimento celular do sistema imune, que pode ser prejudicial ao hospedeiro. Nesse sentido, um estudo analisou o perfil de citocinas produzido pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com cardiomiopatia chagásica e de pacientes assintomáticos soropositivos para *T. cruzi*, mostrando que pacientes com cardiomiopatia chagásica apresentam alta produção de IFN- γ . Além disso, observou-se que o infiltrado presente no tecido cardíaco desses pacientes é composto predominantemente por células produtoras de IFN- γ e TNF- α sugerindo que

essas citocinas possam estar envolvidas no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica (ABEL *et al.*, 2001).

Citocinas do padrão Th2 foram associadas inicialmente com susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992; CARDILLO *et al.*, 1996). A administração de anticorpos neutralizantes anti-IL-10 confere resistência à infecção por *T. cruzi* em linhagem de camundongo susceptível, sendo tal resistência relacionada com o aumento da produção de IL-12 e IFN- γ (REED *et al.*, 1994), uma vez que IL-10 tem a capacidade de inibir a atividade microbida de macrófagos induzida por IFN- γ como também a produção de TNF- α (HUNTER *et al.*, 1996). Mais recentemente a infecção de camundongos geneticamente deficientes de IL-10 por *T. cruzi* resultou em parasitemia reduzida, mas com mortalidade aumentada (HUNTER *et al.*, 1997) associada a choque tóxico mediado por TNF- α (HOLSCHER *et al.*, 2000). Mostrando assim, que IL-10 é importante na prevenção do desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada, uma vez que os mesmos apresentaram níveis maiores de IFN- γ , IL-12 e TNF- α .

1.3 A galectina-1 e o *Trypanosoma cruzi*

Tem-se demonstrado em um modelo experimental de infecção in vitro por *T. cruzi*, que concentrações muito baixas de Gal-1 são suficientes para diminuir a produção de IL-12 (citocina crítica para a morte do parasita) de macrófagos infectados sem afetar a secreção de citocinas do padrão Th2 (ZÚÑIGA *et al.*, 2001). Zúñiga *et al.* (2001) também descreveram uma relação dose dependente entre Gal-1 e óxido nítrico. Quanto maior a presença de Gal-1, menor a produção de óxido nítrico. Além disso, os autores observaram que há um aumento de Gal-1 endógeno em macrófagos da linhagem J774 infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Giordanengo *et al.* (2001) descreveram a presença de auto-anticorpos contra Gal-1 em pacientes com doença de Chagas, mas falharam em detectar imunoreatividade de um anticorpo policlonal contra Gal-1 recombinante humana em *T. cruzi*. Ensaio realizados com soro de pacientes com doença de Chagas não demonstraram reação contra a proteína SAPA (“*Shed Acute Phase Antigen*”), uma proteína secretada pelo parasita com homologia para Gal-1. Neste mesmo estudo, confirmou-se o aumento de Gal-1 endógena no extrato de coração de pacientes com a doença em fase crônica. Correa *et al.* (2003), estudando a marcação de Gal-1 endógeno em

macrófagos residentes, inflamatórios e ativados, correlacionou a expressão da galectina com o estado de ativação da célula, sugerindo o seu papel imunoregulatório em situações de estresse inflamatório. Gal-1 modula eventos da resposta inflamatória e imune adaptativa importantes na infecção por *T. cruzi*, como modulação da geração de óxido nítrico (NO) e da expressão da óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) por macrófagos *in vitro* (CORREA *et al.*, 2003), da geração de prostaglandina E₂ (RABINOVITCH *et al.*, 2000), modulação da liberação de citocinas padrão T_h1 e T_h2 (GARÍN *et al.*, 2007; TOSCANO *et al.*, 2007), homeostase linfocitária (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2008). Nessa linha, foi descrito que Gal-1 é capaz de promover, *in vitro*, a modulação da proliferação de *T. cruzi* (ZUÑIGA *et al.*, 2001). Sabe-se também que a indoleamina-2,3-desoxigenase (IDO) é importante na eliminação de parasitas intracelulares (NAGINENI *et al.*, 1996). De modo interessante, Gal-1 e IDO participam dos mesmos processos imunoregulatórios (TERNESS *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não foi descrita na literatura uma possível correlação positiva e/ou negativa entre Gal-1 e IDO no controle da replicação de *T. cruzi*.

De acordo no que foi exposto acima, este trabalho visa avaliar e caracterizar o papel da Gal-1, tanto endógena como exógena, na evolução da infecção experimental por *T. cruzi*, em modelo *in vivo*.

2. Objetivos

- Avaliar o envolvimento da galectina-1 exógena na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*,
- Avaliar o envolvimento da galectina-1 endógena na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*.

3. Metodologia

3.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica

As galectinas foram obtidas de culturas de bactérias (*E. coli* cepa M-15) transformadas com plasmídeo PQU-50 contendo o gene completo da galectina-1. A indução da expressão desta proteína pelas bactérias foi feita por isopropil β -D-tiogalacto-piranozído (IPTG). Os sobrenadantes brutos das culturas de bactérias contendo a referida lectina foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose. Esse processo cromatográfico foi monitorado por leitura de densidade óptica (280 nm) e eletroforese em gel de poliacrilamida. As bactérias citadas foram cedidas, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings, chefe do *Biochemistry Department da Medicine College da Emory University*, Atlanta, Georgia – EUA. As concentrações protéicas das soluções de galectina-1 foram determinadas pelas absorvâncias em 280 nm e estes valores foram convertidos para concentração (mg/mL) com o uso do coeficiente de extinção molar (1,17) destas moléculas.

Após esta etapa, as frações de Gal-1 foram tratadas com iodoacetamida (37mg para cada 12 mg de Gal-1) por 24 horas, para alquilação de seus sítios oxidáveis, o que aumenta sua estabilidade, porém preserva sua capacidade lectínica. As frações foram então repurificadas em coluna de exclusão molecular (PD10) e submetidas a uma coluna de polimixina, a fim de se remover resíduos de lipopolissacarídeos (LPS) provenientes da etapa de purificação do lisado bacteriano, os quais poderiam promover inflamação quando injetados nos animais. Por fim, após a etapa de remoção do LPS, as alíquotas de Gal-1 foram filtradas em membrana de 0,22 μ m para sua esterilização, aliquotadas e armazenadas a 4°C para as posteriores etapas de tratamento.

3.2 Animais de experimentação

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos da linhagem C57BL/6, selvagens (Gal-1^{+/+}), ou destituídos do gene para galectina-1 (Gal-1^{-/-}) fêmeas e adultas, pesando de 25-30 g. O presente trabalho foi aprovado do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA - USP, Campus de Ribeirão Preto – Protocolo nº 08.1.587.53.1).

Os camundongos Gal-1^{+/+} e Gal-1^{-/-} foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Os animais destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1^{-/-}) foram cedidos, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings, chefe do *Biochemistry Department* do *Medicine College* da *Emory University*, Atlanta, Georgia – EUA.

3.3 Cultura e obtenção de tripomastigostas de *T.cruzi* *in vitro*

Formas tripomastigostas de *T. cruzi*, cepa Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953), foram cultivadas em culturas de células LLC-MK₂ (*American Type Culture Collection*, ATCC, CCL7.1), segundo procedimento adaptado de Schenkman *et al.*, 1991. Garrafas de cultura de 75 cm², com culturas sub-confluentes de células LLC-MK₂ foram infectadas com cerca de 10⁶ tripomastigotas recém-separadas de sangue de camundongos em fase aguda da infecção com *T. cruzi*. A cultura foi então mantida em meio RPMI completo, contendo 10% de soro bovino fetal (SBF), a 37°C e 5% de CO₂. A separação dos tripomastigotas da cultura foi feita centrifugando-se o sobrenadante a 1000 x *g* por 30 minutos a 4°C.

3.4 Obtenção e manutenção de *T.cruzi* *in vivo*

Em todos os experimentos *in vivo* realizados foram utilizadas formas tripomastigotas das cepas Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) de *T. cruzi*, mantidas por passagens seriadas deste parasita em camundongos Swiss. Os camundongos foram infectados intraperitonealmente com 1000 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, diluídas em 0,2 mL de tampão fosfato (*phosphate buffer solution*, PBS), e os parasitas foram separados do sangue na fase aguda da infecção (7 a 10 dias após infecção).

3.5 Avaliação do impacto da Galectina-1 exógena, na evolução da infecção experimental *in vivo* por *T. cruzi*

3.5.1 Infecção de camundongos C57BL/6 com *T. cruzi* e tratamento com Gal-1

Camundongos C57BL/6, com peso entre 25 e 30 g, selvagens (Gal-1^{+/+}) foram devidamente anestesiados e infectados intraperitonealmente com 1000 tripomastigotas obtidas do sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*, cepa Y. Um grupo de 6 animais foi tratado com galectina-1, cada animal recebendo 10 µg de Gal-1 em 200 µL de PBS, injetados intraperitonealmente, considerando três fases de tratamento diários, segundo o esquema abaixo: I) por cinco dias consecutivos, do dia anterior da infecção ao 4º dia pós-infecção; II) do 7º ao 10º dias de infecção; III) do 15º ao 20º dia de infecção, conforme procedimento adaptado de Camby *et al.*, 2006. Outro grupo, com 5 animais com mesma idade e peso, também infectados, receberam 200 µL de PBS, obedecendo a mesma escala de tratamento citada. Passados 20 dias, os animais foram eutanasiados, o soro total separado e armazenado a -20°C e o coração removido e fixado em PBS formaldeído 10% para posteriores experimentos.

Diagrama esquemático dos procedimentos de infecção com *T. cruzi*, tratamento com Gal-1 e determinação da parasitemia dos camundongos.

3.5.2 Parasitemia

O número de parasitas no sangue circulante foi determinado em diferentes dias após a infecção de acordo com o método previamente descrito por Melo & Brener (1978). Brevemente, 5 μ L de sangue da cauda dos animais infectados foram colhidos, colocados sobre uma lâmina, e cobertos por uma lamínula 22x22 mm, de modo a se obter uma camada delgada ocupando homogeneamente toda a superfície da lamínula. Essa preparação foi levada ao microscópio óptico (400x), determinando-se o número de parasitas em um total de 100 campos. Conhecendo-se a área de cada campo microscópico, foi possível determinar o número de parasitas por mm^3 e, então, por mL. Os animais tiveram a parasitemia determinada a cada dois dias, do 7º ao 18º dias de infecção, de acordo com o esquema ilustrado anteriormente.

3.5.3 Histopatologia e contagem de células do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco

Os animais infectados dos diferentes grupos experimentais foram anestesiados e eutanasiados 20 dias após a infecção por *T. cruzi* e a aplicação do esquema de tratamento. Amostras de coração foram fixadas em solução de formaldeído tamponada a 10%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcool 70%, clarificadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Cortes de 5 μ m de espessura foram feitos com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 59-60°C para fixação. Em seguida, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool, do absoluto a 80%. Os cortes reidratados foram lavados em água e corados com hematoxilina e eosina (H & E). Posteriormente, foram desidratados com concentrações crescentes de álcool, lavados com xilol e as lâminas recobertas com lamínulas (NOMIZO *et al.*, 2006).

A quantidade de células inflamatórias foi determinada nos animais tratados com PBS ou Gal-1 (após 20 dias de infecção) em lâminas de material parafinado e coradas com hematoxilina e eosina. Foi determinada a quantidade total de células inflamatórias, sem diferenciação entre o tipo celular. Foram selecionados 10 campos distribuídos aleatoriamente por todo o corte de coração e contado o número de células arredondadas do interstício. O aumento utilizado foi 640x e o resultado

expresso em número de células inflamatórias por campo. A análise foi realizada através do programa Leica QWin em conjunto com um microscópio Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Inglaterra), videocâmera (Leica DFC 300FX, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador on-line.

3.5.4 Produção sérica de citocinas em animais infectados por *T. cruzi* e tratados com Gal-1 exógena

A presença de citocinas nos soros dos animais tratados com PBS ou Gal-1 foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo sanduíche. Previamente placas de 96 poços com alta afinidade para proteínas, (Maxisorp, Nunc), foram sensibilizadas com 50 µL/poço, na diluição sugerida pelo fabricante, com anticorpos captura para IFN- γ , TNF- α e IL-12 por 16 horas a 4°C. Todos os mAbs utilizados na sensibilização foram adquiridos da Pharmingen, CA. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente com PBS acrescido de 10% (p/v) de soro bovino fetal (200 µL/poço) e depois lavadas por seis vezes com PBS acrescido de 0,05% (v/v) de Tween20 (PBS-T), em Auto Strip Washer.. Em seguida, 50 µL dos sobrenadantes de cultura ou as citocinas recombinantes padrão (Pharmingen) foram adicionadas aos poços e incubadas por 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas quatro vezes (200 µL/poço) com PBS-T e incubadas com 50 µL/poço dos respectivos anticorpos de detecção biotinilados (Pharmingen) diluídos em PBS-T e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As placas lavadas por 4 vezes com PBS-T e 50 µL de avidina conjugada à peroxidase diluída 1/500 em PBS-T foram adicionados aos poços e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, após seis lavagens com PBS-T, a reação foi revelada com a adição de 50 µL de tampão de revelação (0,5 mg/mL de Ortofenilenodiamino (OPD), diluído em tampão citrato, pH 5,0 contendo 0,05% de H₂O₂). Após aproximadamente de 15 minutos a reação foi interrompida adicionando-se aos poços 50 µL de ácido sulfúrico 4N. A leitura das absorvâncias foi medida a 492 nm em leitor de ELISA (ELx50 – Bio-Tek Instruments, INC., Winooski, VT). A quantificação de citocinas nos sobrenadantes foi determinada através de obtenção de curva padrão, utilizando citocinas recombinantes com concentrações sabidamente conhecidas.

3.6 Avaliação da participação da Galectina-1 endógena na evolução da infecção experimental *in vivo* por *T. cruzi*

3.6.1 Infecção de camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 com *T. cruzi*

Para os experimentos de imunofenotipagem, parasitemia, mortalidade, cultura de células de baço, dosagem de citocinas e de nitritos, camundongos C57BL/6 fêmeas, com peso entre 25 e 30 g, destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram devidamente anestesiados e infectados intraperitonealmente com 1000 tripomastigotas obtidas do sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*, cepa Y, diluídas em 0,2 mL de PBS. Foram utilizados cerca de 20 animais por grupo experimental.

3.6.2 Parasitemia e mortalidade

O número de parasitas no sangue circulante foi determinado em diferentes dias após a infecção de acordo com o método previamente descrito por Melo & Brener (1978), conforme citado no item 3.5.2. Os animais tiveram a parasitemia determinada a cada dois dias, do 5º ao 14º dias de infecção.

A mortalidade dos animais infectados foi determinada através da observação diária dos animais durante um período de 60 dias.

3.6.3 Obtenção de células de baço

Os animais infectados e controles não-infectados foram anestesiados, o sangue destes animais foi colhido, o soro separado e mantido a -70°C para posterior análise de citocinas. Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical, os baços removidos cirurgicamente e pesados em balança semi-analítica. As células de baço foram obtidas por perfuração da cápsula do órgão com agulha hipodérmica e subsequente injeção de meio RPMI-C para a retirada das células. Em seguida, as células foram lavadas por três vezes a 300 x g durante 5 minutos a 4°C, ressuspensas em 2 mL de meio RPMI, contadas e utilizadas para fins experimentais.

3.6.4 Obtenção de sobrenadantes de cultura celular

Preparações de células de baço dos diferentes grupos experimentais obtidas conforme descrito acima foram ressuspensas em meio completo RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis) suplementado com 10% SBF (Gibco, Brasil), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (2-ME; Sigma Chemical Company, St. Louis), 20 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Company, St. Louis) e 20 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de gentamicina (Shering-Plough, Rio de Janeiro) [RPMI-C]. Para a obtenção dos sobrenadantes de cultura, as células esplênicas foram acondicionadas em placas estéreis de 12 poços, na concentração de 5×10^6 células/mL/poço. As placas foram mantidas em estufa de CO_2 a 37°C , em atmosfera úmida com 5% de CO_2 em ar. Os sobrenadantes foram colhidos após 24 e 48 horas de incubação e mantidos a -70°C para posterior análise de presença de nitritos (NOMIZO *et al.*, 2005).

3.6.5 Produção sérica de citocinas em animais infectados por *T. cruzi*

A presença de citocinas nos soros dos camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1, infectados ou não com *T. cruzi* foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo sanduíche, conforme descrito no item 3.5.4. Foram determinadas as concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-4 e IL-10 nessas amostras.

3.6.6 Análise fenotípica das populações celulares do baço por citometria de fluxo

Os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com PE (r-ficoeritrina), FITC (isotiocianato de fluoresceína) e PerCP (proteína peridina clorofil) foram utilizados nos experimentos: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD25, anti-CD44, anti-F4/80, anti-Mac-3, anti-CD11c, anti-CD86, anti-NK1.1. Todos os reagentes utilizados na imunofenotipagem foram adquiridos da BD-Pharmingen, CA, com exceção do anticorpo para F4/80 adquirido da Serotech, Raleigh, NC. A marcação das células foi realizado seguindo o protocolo descrito anteriormente (NOMIZO *et al.*, 2006). As células do baço foram ressuspensas a uma concentração de 5×10^6 células/mL em PBS contendo 1% de soro bovino fetal e 0,1% de azida sódica

(Tampão de FACS). Em seguida, alíquotas de 200 µL de células foram colocadas nos poços em placas de 96 poços, fundo em U, centrifugadas por 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado. O “pellet” de células foi desfeito após agitação e as células incubadas com 200 µL de Fc-block (BD-Pharmingen, CA), na diluição 1/500 em tampão de FACS, por 20 minutos a 4°C. Ao findar da incubação, as células foram centrifugadas 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais relevantes conjugados com PE, FITC, e PerCP diluídos em tampão de FACS conforme sugerido pelo fabricante, incubadas por 30 minutos a 4°C protegidos da luz e lavadas três vezes com 200 µL de tampão de FACS a 2000 rpm durante 15 segundos. As células foram então ressuspensas em 200 µL de tampão de FACS. Finalmente, as células foram submetidas a leitura no citômetro de fluxo [FACSCanto - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA] sendo analisadas 20000 células, utilizando os detectores e canais adequados para a leitura de cada fluorocromo. As análises dos resultados foram realizadas no *software* FACSDiva – BD.

3.6.7 Dosagem de nitritos (NO₂)

O óxido nítrico (NO) produzido pelas células é uma molécula instável, e em cultura rapidamente se transforma em nitritos (NO₂). Para determinar os níveis de nitritos em sobrenadantes de cultura celular, a concentração de nitritos foi determinada através da reação de Griess (GILLIAM *et al.*, 1993; VESPA *et al.*, 1994).

3.6.8 Histopatologia e contagem de células do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco

Amostras dos tecidos cardíacos de animais selvagens e Gal-1^{-/-} infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e sacrificados nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-infecção foram devidamente fixadas e processadas para a caracterização do infiltrado inflamatório, conforme descrito no item 3.5.3.

3.7 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na resposta inflamatória no sítio de infecção por *T. cruzi*

3.7.1 Avaliação fenotípica de células recrutadas para o sítio de infecção por *T. cruzi* por citometria de fluxo

Camundongos C57BL/6 fêmeas, com peso entre 25 e 30 g, destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados intraperitonealmente com 1000 tripomastigotas obtidas do sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*, cepa Y, diluídas em 0,2 mL de PBS. Após 6, 12, 24 e 48 horas de infecção, os animais foram devidamente anestesiados e eutanasiados, e as células da cavidade peritoneal foram obtidas pela injeção de 2 mL de meio RPMI-C no peritônio destes animais. O exsudato foi retirado com auxílio de agulha e seringa, colocadas em tubos plásticos de 50 mL e lavadas 2 vezes a 300 x g por 5 min a 4°C. Ao final da segunda lavagem as células foram ressuspensas em tampão de FACS, contadas e o procedimento de marcação para análise por citometria de fluxo foi feito conforme o item 3.6.6. Os anticorpos utilizados foram anti-Gr1, anti-CD11b, anti-IAb e anti-F4/80, marcados com os fluorocromos FITC (isotiocianato de fluoresceína) e PerCP (proteína peridínica clorofil) e APC (aloficocianina).

3.8 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na atividade tripanocida de células peritoneais aderentes

3.8.1 Avaliação da liberação de formas tripomastigotas por células peritoneais aderentes infectadas por *T. cruzi*

As células da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram obtidas pela injeção de 4 mL de meio RPMI-C no peritônio destes animais. O exsudato foi retirado com auxílio de agulha e seringa, colocadas em tubos plásticos de 50 mL e lavadas 2 vezes a 1200 rpm por 5 min a 10°C. Ao final da segunda lavagem as células foram ressuspensas em meio RPMI-C e contadas. Uma concentração de 5×10^5 células/500 µL/poço foram distribuídas em placa de 24 poços e incubadas em estufa de CO₂ por 24 h a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Ao findar do período de incubação, as

células não-aderentes foram removidas lavando 3 vezes os poços com meio RPMI-C. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas por sobrenadante de cultura de células LLCMK₂ (3 parasitas:1 macrófago) foram suspensas em 500 µL de meio RPMI-C, colocadas nos poços e incubadas por mais 3 h (TALVANI *et al.*, 2002). Após este tempo, os tripomastigotas não associados aos macrófagos foram retirados por sucessivas lavagens com meio RPMI. As placas foram incubadas por 5 dias em estufa nas condições já citadas. Diariamente, os sobrenadantes foram coletados e meio novo adicionado aos poços. Os sobrenadantes foram centrifugados a 1000 x g a 4°C por 10 minutos. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi removido cuidadosamente e o “pellet” foi ressuspenso em 50 µL de solução de azul de tripan 0,1%/formaldeído 10% para a conservação das formas tripomastigotas liberadas, que foram então contadas em câmara de Neubauer.

3.8.2 Dosagem de nitritos

O sobrenadante da cultura de células da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 e infectados por *T. cruzi* foi armazenado a -20°C para posterior dosagem de nitritos, resultante da produção de óxido nítrico por essas células. Tal dosagem foi feita pela reação de Griess, conforme descrito no item 3.6.7.

3.9 Análise de resultados

A análise estatística utilizada para comparação entre os diferentes grupos experimentais foi a análise de variância (ANOVA) “two-way”, seguido do pós-teste de Bonferroni, ou, para comparação de dois grupos em um único ponto, Teste t de Student não-pareado, através do programa GraphPad Prism (versão 4 Prism, GraphPad, USA).

4. Resultados e discussão

4.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica

As preparações de galectina-1 recombinante humana dimérica (Gal-1) purificada foram obtidas por cromatografia de afinidade em colunas de agarose-lactose de lisados de bactéria transformadas com o gene completo da galectina-1 e tratadas com o indutor de expressão gênica (IPTG). A produção média da Gal-1 purificada foi de 35 mg/litro de cultura de bactérias. O perfil da cromatografia de afinidade, monitorado pela densidade óptica em 280 nm, é mostrado na Figura 1A. Considerando que a Gal-1 perde sua capacidade de reconhecimento de carboidratos na ausência de seus ligantes e/ou agentes redutores (VARKI, *et al.*, 1999) as preparações de Gal-1 purificada foram estocadas a -80°C em tampão de eluição (PBS acrescido de 100 mM de lactose e 14 mM de 2-mercaptoetanol, 2-ME). Imediatamente antes do uso, as preparações de Gal-1 foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (PD10) para remoção da lactose e do 2-ME. Este procedimento foi acompanhado por leitura da absorbância em 280 nm (Figura 1B). A análise eletroforética do pico de eluição obtido da cromatografia em colunas de agarose-lactose demonstrou a presença de duas bandas protéicas sendo uma majoritária com massa molecular aparente de 15 kDa e uma minoritária de aproximadamente 31 kDa (Figura 2, pista 3). Experimentos de *Western-blotting*, usando anticorpo monoclonal anti-Gal-1 mostraram que essas duas bandas protéicas correspondiam a forma monomérica (15 kDa) e dimérica (31 kDa) dessa lectina, o que foi confirmado por espectrometria de massas (dados não mostrados). Desta forma, a estratégia de purificação da Gal-1 foi muito eficiente, pois apenas com uma etapa de purificação foi possível obter preparações de Gal-1 com alto grau de homogeneidade a partir do extrato bruto bacteriano. Além disso, a Gal-1 produzida apresentou-se com sua atividade lectínica preservada, uma vez que a etapa de purificação em agarose-lactose removeu completamente a Gal-1 do extrato bacteriano (Figura 2, pista 1 e 2). Os resultados obtidos nesta fase estavam de acordo com dados já descritos na literatura (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003) e forneceram subsídios necessários para a continuidade experimental do trabalho.

Figura 1 – Perfis cromatográficos referentes à purificação de Gal-1 e à remoção de lactose e 2-ME das preparações de Gal-1. Foram obtidos aproximadamente 40 mg de galectina-1 recombinante humana por litro de cultura bacteriana. Os extratos bacterianos foram aplicados em uma coluna agarose-lactose e o material retido foi eluído com PBS acrescido de lactose (100 mM) e 2-ME (14 mM). As amostras de Gal-1 foram aplicadas em coluna de exclusão molecular (PD-10) para a remoção da lactose e do 2-ME. Os perfis da cromatografia de afinidade e de exclusão molecular estão indicados nos painéis A e B, respectivamente. As frações cromatográficas foram monitoradas por absorvância em 280nm. A concentração protéica das frações foram calculadas com o uso do coeficiente de extinção molar da Gal-1 (1,17) e expressa em mg/mL. Os números em destaque nos gráficos referem-se à concentração de Gal-1.

Figura 2 – Análise eletroforética do procedimento de obtenção da Gal-1 ativa e purificada.

Perfil do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com amostras de diferentes etapas da produção de Gal-1: **1** - lisado bacteriano bruto após indução com IPTG; **2** – Fração do lisado bacteriano não retida na coluna de agarose-lactose (*flow-through*); **3** – Amostra da galectina-1 purificada. As frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida (15%) em condições redutoras e dissociantes e o gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue*. Na pista 3, nota-se uma banda majoritária com massa molecular aparente de aproximadamente 14,9 kDa (forma monomérica da Gal-1) e outra minoritária com aproximadamente 31kDa (forma dimérica da Gal-1). A massa molecular (MM) aparente da Gal-1 foi estimada com o auxílio de diferentes marcadores com MM de 97 a 14,4 kDa.

4.2 Avaliação do impacto da Galectina-1 exógena, na evolução da infecção experimental *in vivo* por *T. cruzi*

4.2.1 Parasitemia

Diante dos inúmeros relatos da literatura destacando os benefícios da administração de Gal-1 em modelos de doenças inflamatórias (LIU & RABINOVICH, 2010; TOSCANO *et al.*, 2007; CAMBY *et al.*, 2006; SANTUCCI *et al.*, 2000; RABINOVICH *et al.*, 1999b), porém de poucos dados sobre essa aplicação em modelos de doenças infecciosas (ZUNIGA *et al.*, 2001a), decidimos avaliar o efeito da administração de Gal-1 exógena no modelo de infecção murina por *T. cruzi*. Para avaliação do impacto do tratamento com Gal-1 exógena no número de parasitas circulantes no sangue, camundongos C57BL/6 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas cada, por via intraperitoneal, e divididos em dois grupos: o grupo tratado, que recebeu 10 µg de Gal-1 em 200 µL de PBS em três etapas de tratamentos diários (início da infecção, pico de parasitemia e início da infecção crônica), e o grupo controle, que recebeu apenas 200 µL de PBS, seguindo a mesma escala do grupo tratado. O número de parasitas circulantes foi analisado segundo o método descrito por Melo & Brener (1978), e a evolução da parasitemia nos dois grupos encontra-se ilustrada na Figura 3. Nota-se que o tratamento com Gal-1 resultou numa diminuição acentuada ($P < 0,001$) do número de parasitas circulantes no sangue dos animais, em relação a grupo controle que recebeu apenas o veículo de diluição da Gal-1 (PBS).

Figura 3 – O tratamento de animais infectados com Gal-1 exógena reduz o número de *T. cruzi* circulante no sangue desses animais. Camundongos C57BL/6 infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram tratados (triângulos) ou não (quadrados) com 10 µg de Gal-1 exógena (sem LPS e alquilada) e tiveram sua parasitemia monitorada durante o curso da infecção aguda (do 7º. ao 15º. dia). O grupo controle foi tratado apenas com PBS. Nota-se uma diminuição acentuada no número de parasitas circulantes no grupo de animais tratados com Gal-1 (* $P < 0.001$). Cada grupo foi composto por 5 animais e as análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) “two-way”, seguida de pós-teste de Bonferroni.

Após 20 dias de infecção, os animais foram devidamente anestesiados, o sangue total coletado e o soro separado e armazenado (-80°C) para posteriores dosagens de citocinas. Os corações foram removidos e fixados para análise histopatológica.

Os perfis de parasitemia encontrados para os dois grupos de animais selvagens e infectados com *T. cruzi* (tratados ou não com Galectina-1 exógena) mostram que o tratamento com Gal-1 resultou numa diminuição significativa do número de parasitas circulantes no sangue desses animais no 9º dia de infecção: média de 438.400 parasitas/mL de sangue do grupo controle contra média de 311.700 parasitas/mL de sangue do grupo tratado com Gal-1 (Figura 3). Nos outros dias em que a parasitemia foi monitorada, não se observou tal diferença.

O início do tratamento com Gal-1 no dia anterior à infecção com *T. cruzi* pode ter levado a mudanças no microambiente celular do peritônio, uma vez que Gal-1 pode diminuir o recrutamento de neutrófilos (LA *et al.*, 2003) e linfócitos (NORLING *et al.*, 2008) para a cavidade peritoneal. A galectina-1 pode também promover um ajuste da resposta imune celular no sentido de proteger o hospedeiro contra uma resposta imune e/ou inflamatória exacerbada, favorecendo o estabelecimento de uma resposta de padrão Th2, e mantendo os níveis de citocinas padrão Th1 (como IFN- γ) próximos aos homeostáticos (TOSCANO *et al.*, 2007; MOTRAN *et al.*, 2008; STOWELL *et al.*, 2008). Ainda nessa linha, galectina-1 pode mudar o perfil de ativação de macrófagos peritoneais *in vivo* (CORREA *et al.*, 2003) e *in vitro* (ZUÑIGA *et al.*, 2001a).

No dia da infecção os animais também receberam tratamento com Gal-1, que dessa forma pode continuar agindo na modulação de resposta imune do hospedeiro, porém também pode interagir diretamente com as tripomastigotas de *T. cruzi* (dados não mostrados), no momento da infecção. Essa interação pode desfavorecer a adesão de *T. cruzi* aos macrófagos residentes do peritônio, diminuindo sua entrada na célula em que se dá o primeiro estágio de invasão e replicação deste protozoário intracelular. Galectina-1 pode levar também a uma inibição da adesão/invasão de *T. cruzi* com outras células que poderiam ser parasitadas, uma vez que essa lectina pode inibir a adesão célula/matriz e célula/célula (ZHOU & CUMMINGS, 1993; LA *et al.*, 2003). Conjuntamente, esses fatores podem contribuir para uma modulação da replicação de *T. cruzi* no início da infecção, o que poderia explicar esse controle da parasitemia do grupo de animais tratado com Gal-1.

Para aprofundar a investigação do mecanismo pelo qual a Gal-1 exógena poderia estar contribuindo para essa menor parasitemia observada nos animais tratados com essa lectina, diferentes experimentos de infecção e tratamento poderiam ser conduzidos, dividindo os animais a ser tratados com Gal-1 em diferentes grupos: (i) os que receberiam tratamento apenas nos primeiros dias de infecção, para saber se a ação de Gal-1 se dá diretamente sobre o parasita injetado no peritônio no momento da infecção e/ou se essa lectina causa uma modulação nas células peritoneais residentes, de forma a responder de forma diferente contra o *T. cruzi*; (ii) os que vão ser tratados apenas no pico da infecção (entre o 7º e 10º dias pós-infecção), para avaliação se o tratamento com Gal-1 tem ação imunorregulatória sistêmica neste modelo de infecção. Experimentos *in vitro* também poderiam ajudar a responder tais questões, como o tratamento das células aderentes peritoneais com Gal-1 e posterior infecção com *T. cruzi*, bem como o tratamento das formas tripomastigotas do parasita com esta lectina antes da infecção *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, estes experimentos serão monitorados por parâmetros imunológicos e imunopatológicos.

4.2.2 Histopatologia e contagem de células do infiltrado inflamatório

Após 20 dias de infecção com *T. cruzi* e a aplicação do esquema de tratamento com Gal-1 ou PBS, camundongos C57BL/6 foram anestesiados, eutanasiados e os corações removidos cirurgicamente para análise histológica. Os tecidos foram devidamente fixados, desidratados, cortados em micrótomo e corados com hematoxilina e eosina (H & E) para a avaliação do efeito do tratamento com Gal-1 exógena no infiltrado inflamatório destes tecidos. O tempo de 20 dias de infecção para análise histopatológica foi escolhido devido à queda nos valores de parasitemia próximos aos indetectáveis, e devido à proximidade temporal do pico de infiltrado inflamatório no miocárdio (comunicação pessoal de Cibele M. Prado – Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto). Para isso, foi contado o total de células arredondadas localizadas no interstício do tecido cardíaco, por 10 campos aleatórios, sem diferenciação do tipo celular. O valor médio de células inflamatórias por campo e a distribuição de frequência dessa contagem encontram-se na Figura 4. Nota-se que o tratamento com Gal-1 resultou numa diminuição acentuada ($P < 0,01$) das células do infiltrado inflamatório no tecido dos

animais infectados com *T. cruzi*, em relação a grupo controle que recebeu apenas o veículo de diluição da Gal-1 (PBS).

Alguns trabalhos demonstram, em biópsias do coração de indivíduos infectados com *T. cruzi* na fase aguda, a ocorrência de alterações histopatológicas que incluem a presença de intenso infiltrado inflamatório, predominantemente de células mononucleares, presença de ninhos (contendo formas amastigotas) e menos frequentemente pequenas áreas de necrose focal do miocárdio (ANSELMINI & MOLEIRO, 1972; ANDRADE, 1985; PRATA, 2001). Essa miocardite aguda é um processo inflamatório no tecido cardíaco que é parte essencial da resposta protetora do hospedeiro contra a infecção (BRENER & GAZZINELLI, 1997), porém pode provocar lesões que podem ser prejudiciais ao tecido cardíaco do indivíduo infectado. A diminuição significativa do infiltrado celular inflamatório nos animais infectados e tratados com Gal-1 comprova o caráter imunorregulatório e protetor dessa lectina, já demonstrado em diversos modelos de inflamação crônica, como a encefalomielite autoimune experimental (TOSCANO *et al.*, 2007). Nesse contexto, foi mostrado ainda que galectina-1 inibe o edema, o extravasamento de neutrófilos e a desgranulação de mastócitos (RABINOVICH *et al.*, 2000b), além da inibição da migração de neutrófilos na peritonite murina (COOPER *et al.*, 2008; LA *et al.*, 2003) e inibição *in vivo* do tráfego de linfócitos para linfonodos e tecidos inflamados (NORLING *et al.*, 2008).

Novamente, para chegar a uma conclusão de como a galectina-1 pode diminuir esse recrutamento de células inflamatórias para o miocárdio, é necessário que se conduza outros experimentos de infecção e tratamento com Gal-1, no início da infecção e no pico da fase aguda. Dessa maneira, seria possível responder se esse menor infiltrado inflamatório se dá por uma menor carga de *T. cruzi* que conseguiu infectar as células residentes do peritônio e cair na corrente sanguínea, ou se há um efeito imunomodulatório sistêmico da galectina-1 que bloqueie o recrutamento de células para o tecido cardíaco.

Figura 4 – A administração intraperitoneal de Gal-1 em animais infectados por *T. cruzi* provoca uma redução no número de células do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco desses animais. Camundongos C57BL/6 infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram tratados ou não com 10 µg de Gal-1 exógena (sem LPS e na forma alquilada) e então eutanasiados por inalação de CO₂ no 20º dia de infecção. O número de células inflamatórias representam a média ± EPM da contagem de 10 campos dos corações de 5 animais por grupo. A contagem de células inflamatórias no interstício do tecido cardíaco corado com H&E revela um menor número de infiltrado inflamatório nos animais que foram tratados com Gal-1, em relação àqueles animais que receberam apenas PBS, veículo de diluição. O método estatístico usado foi o Teste t de Student não-pareado (**P<0.01).

Ainda, analisar em sistemas *in vitro* se galectina-1, exógena e endógena, pode modular a infecção de cardiomiócitos por esse parasita.

4.2.3 Produção sérica de citocinas em animais infectados por *T. cruzi* e tratados com Gal-1 exógena

Baseados no fato de que a miocardite aguda provocada por *T. cruzi* é mediada por uma resposta inflamatória de padrão T_H1 (HIGUCHI *et al.*, 1993; TALVANI *et al.*, 2000; ABEL *et al.*, 2001), foi quantificada a concentração sérica de IFN- γ , IL-12 e TNF- α presentes nos camundongos infectados. O soro dos camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados ou não com Gal-1 exógena foi separado no 20º dia pós-infecção e armazenado (-80°C) para a determinação da concentração de citocinas por ELISA. Os resultados destas dosagens estão ilustrados na Figura 5. Nota-se que os soros dos animais tratados com Gal-1 apresentaram menores concentrações de IFN- γ , ($P < 0,05$), enquanto que as concentrações de TNF- α e IL-12 não apresentaram diferença estatística relevante entre os grupos. O papel do IFN- γ no controle da infecção por *T. cruzi* já é bem estabelecido (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001; LYKENS *et al.*, 2010). A menor concentração de IFN- γ sérico encontrada nos animais tratados com Gal-1 está de acordo com diversos relatos da literatura, que mostram que o tratamento com Gal-1 tem propriedades antiinflamatórias e imunorregulatórias em diversos modelos de doenças autoimunes experimentais (LIU, 2005; BLOIS *et al.*, 2007; TOSCANO *et al.*, 2007). Nessa linha, foi relatado que essa lectina bloqueia a produção de IL-12 em células infectadas por *Trypanosoma cruzi in vitro* (ZUNIGA *et al.*, 2001a) e inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células T (RABINOVICH *et al.*, 1999a, MOTRAN *et al.*, 2008; STOWELL *et al.*, 2008). Tal caráter imunorregulatório poderia estar auxiliando os animais tratados com Gal-1 no controle da inflamação provocada pela infecção de *T. cruzi*. Porém, como não observamos a diminuição da secreção de IL-12 nos animais tratados com Gal-1, sugerimos que a regulação da produção de IFN- γ pode estar ocorrendo por mecanismos independentes de IL-12, como descrito recentemente por Lipscomb e colaboradores, 2009.

Com base neste conjunto de resultados, sugerimos que os animais tratados com Gal-1 resolveram melhor a infecção por *T. cruzi* e que isso deve ter ocorrido por

um mecanismo complexo, dependente de eventos no local da infecção, e de eventos sistêmicos. No local da infecção, o peritônio, o tratamento com Gal-1 pode ter interferido na interação parasita-células do hospedeiro e, conseqüentemente, na sua entrada nestas células, dificultando a entrada e a posterior replicação deste parasita no interior das células peritoneais. Além disso, como a Gal-1 foi capaz de ligar-se ao *T. cruzi* (dados não mostrados), esta lectina pode ter promovido diretamente a destruição das células deste parasita, uma vez que galectinas se ligam a superfície de agentes infecciosos e induzem a morte destes agentes (STOWELL *et al.*, 2010). Dessa maneira, a carga parasitária inicial estaria reduzida nos animais tratados, conduzindo a uma melhor resolução da infecção. Do ponto de vista sistêmico, uma de nossas hipóteses iniciais seria que o tratamento dos animais infectados com Gal-1 poderia dificultar o controle da infecção aguda por *T. cruzi*, pois esta lectina pode conduzir para uma resposta do padrão Th2 (TOSCANO *et al.*, 2007; MOTRAN *et al.*, 2008), por induzir a apoptose de células Th1 e Th17, que são importantes na resposta imunológica ao parasita (DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010; LYKENS *et al.*, 2010). Entretanto, nossos resultados indicaram que animais tratados com Gal-1 apresentaram menor parasitemia (Figura 3), menor número de células no infiltrado inflamatório cardíaco (Figura 4) e menores concentrações séricas de IFN- γ (Figura 5). Dados da literatura demonstram que Gal-1 endógena é fundamental para a atividade imunorreguladora de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (GARÍN *et al.*, 2007). Além disso, a Gal-1 pode induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias com a IL-10 (VAN DER LEIJ *et al.*, 2004; BLOIS *et al.*, 2007). Nessa linha, recentemente foi demonstrado que a inibição de células T regulatórias com anticorpos anti-CD25 e anti-GITR provocaram um aumento da parasitemia em animais infectados (MARIANO *et al.*, 2008). Assim, sugere-se que o caráter imunorregulatório da Gal-1 pode estar desfavorecendo a exacerbação da resposta inflamatória.

Figura 5 – Gal-1 exógena inibe a produção sérica de IFN γ , mas não TNF- α e IL-12 em animais infectados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram tratados ou não com 10 μ g de Gal-1 exógena (sem LPS e na forma alquilada) e então sacrificados no 20º dia de infecção. Os valores da concentração sérica de IFN γ (**A**), IL-12 (**B**) e TNF- α (**C**) são apresentados em pg de citocina/mL e representam a média $\pm$ EPM do soro de dois animais. A diminuição na concentração de IFN γ foi significativa (* $P < 0,05$). A pequena diminuição na concentração de TNF- α e IL-12 não é significativa ($P > 0,05$). O método estatístico utilizado foi o Teste t de Student não-pareado.

4.3 Avaliação do impacto da Galectina-1 endógena na evolução da infecção experimental *in vivo* por *T. cruzi*

4.3.1 Parasitemia e mortalidade

Para avaliação da participação da Gal-1 endógena no número de parasitas circulantes no sangue, camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas cada, por via intraperitoneal. O número de parasitas circulantes foi analisado segundo o método descrito por Melo & Brener (1978), e a evolução da parasitemia nos dois grupos encontra-se na Figura 6.

Pode-se notar que os animais selvagens (WT, *wild type*) apresentam uma parasitemia significativamente maior no 9º dia pós-infecção ($P < 0,001$) em relação aos animais destituídos do gene da Gal-1 (KO, *knock-out* Gal-1, ou Gal-1^{-/-}). Nos outros dias, essa diferença não foi observada. Tal diferença pode ser atribuída ao caráter imunomodulatório da galectina-1, que pode promover a apoptose de células T produtoras de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (T_H1) e IL-17 (T_H17) e não de células T_H2 por meio de reconhecimento diferencial de glicanas na superfícies dessas células. (MOTRAN *et al.*, 2008; TOSCANO *et al.*, 2007). Além disso, células T regulatórias expressam constitutivamente galectina-1 e essa lectina tem papel na função supressora destas células, uma vez que células T regulatórias humanas (CD4+CD25+) não inibiram a proliferação de células T CD4+CD25- *in vitro* na presença de anticorpo anti-galectina-1 (TOSCANO *et al.*, 2007). Ainda, células CD4+CD25+ provenientes de animais deficientes do gene da Gal-1 ou células T CD4+CD25+ destituídas do RNA mensageiro para essa lectina apresentaram menores atividades regulatórias em comparação a células provenientes de animais selvagens (GARIN *et al.*, 2007). Assim sendo, a galectina-1 endógena, constitutivamente expressa pelos animais WT, estaria favorecendo um ambiente menos nocivo ao parasita (diminuindo um caráter de resposta T_H17 e aumentando a atividade/número de células T CD4+CD25+), favorecendo o estabelecimento e a multiplicação de *T. cruzi* nestes animais. Os animais Gal-1^{-/-}, por sua vez, não teriam uma resposta regulatória tão pronunciada, o que explicaria sua menor parasitemia, talvez por um melhor controle da replicação dos parasitas.

Figura 6 – Avaliação do número de *T. cruzi* circulante no sangue de animais infectados e deficientes ou não do gene da galectina-1. Camundongos C57BL/6 destituídos ($Gal-1^{-/-}$) ou não ($Gal-1^{+/+}$) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tiveram sua parasitemia monitorada durante o curso da infecção aguda (do 5º. ao 14º. dia). Os valores do número de parasitas circulantes são apresentados em parasitas/mL de sangue e representam a média $\pm$ EPM de cinco animais. Nota-se uma diminuição acentuada no número de parasitas circulantes no grupo de animais destituídos (*Knock-out*, KO) do gene da Gal-1 (* $P < 0.001$). A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) “two-way”, seguida de pós-teste de Bonferroni.

Para a avaliação do impacto da galectina-1 endógena na mortalidade dos animais infectados com *T. cruzi*, camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas cada, por via intraperitoneal. Foi feita a observação diária dos dois grupos de animais por 60 dias e a curva de mortalidade encontra-se ilustrada na Figura 7.

Nota-se que o grupo de animais selvagens apresentou um índice de mortalidade significativamente maior ($P < 0,001$) do que o grupo de animais Gal-1^{-/-}. Em experimentos anteriores para a observação da mortalidade destes animais, foi utilizada uma carga de 10000 tripomastigotas, e o resultado foi semelhante ao da Figura 7 (dados não mostrados). A linhagem de camundongos C57BL/6 é geralmente mais resistente a infecções do que outras linhagens, como BALB/c, por exemplo (SANTOS *et al.*, 2006), porém pudemos observar que uma parcela significativa dos animais C57BL/6 infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Y morrem no intervalo de tempo considerado para a observação de mortalidade.

Uma explicação para essa alta mortalidade dos animais selvagens em relação aos animais Gal-1^{-/-} seria a mesma utilizada para justificar a maior parasitemia dos animais selvagens: a expressão constitutiva de Gal-1 criaria um ambiente imunomodulador, que desfavorece o controle da replicação de *T. cruzi*. Uma maior atividade de células T CD4⁺CD25⁺, favorecida pela Gal-1 (GARÍN *et al.*, 2007) modularia negativamente a atividade de células T CD8⁺, por exemplo, responsável pela eliminação de células do hospedeiro infectadas com esse parasita intracelular. Outros trabalhos mostram ainda que galectina-1 reduz a produção de IFN- γ e aumenta os níveis de IL-10 tanto em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) como em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, tendo essa lectina um papel imunorregulador importante (VAN DER LEIJ *et al.*, 2004; VAN DER LEIJ *et al.*, 2007). De modo interessante, animais KO para o gene da IL-10, outra molécula imunorreguladora, apresentaram menor parasitemia (HOLSCHER *et al.*, 2000), como os animais Gal-1^{-/-} (Figura 6). Entretanto, diferentemente dos animais KO IL-10 (HOLSCHER *et al.*, 2000), os animais deficientes do gene para Gal-1 sobreviveram à infecção aguda por *T. cruzi*.

Figura 7 – Avaliação da mortalidade de animais infectados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 destituídos ($\text{Gal-1}^{-/-}$) ou não ($\text{Gal-1}^{+/+}$) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tiveram sua mortalidade monitorada até o 60º dia após a infecção. Os valores da sobrevivência dos animais são apresentados em porcentagem de sobreviventes. Foram utilizados 10 animais para cada grupo. Nota-se uma diminuição acentuada no número de animais selvagens ($\text{Gal-1}^{+/+}$) infectados sobreviventes em relação aos animais KO Gal-1 (** $P < 0.001$). O método estatístico utilizado foi o Teste t de Student não-pareado.

4.3.2 Análise morfológica dos baços dos animais infectados por *T. cruzi* deficientes ou não do gene da galectina-1

Diante dos dados indicando maior parasitemia e maior mortalidade nos camundongos infectados selvagens em relação aos animais Gal-1^{-/-}, procedeu-se a análise do baço desses animais infectados. Para isso, cerca de 20 camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e cinco indivíduos de cada grupo foram devidamente anestesiados e eutanasiados em quatro diferentes períodos de tempos para coleta de soro e análise de diferentes órgãos: 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção. Tal procedimento foi proposto visando avaliar a cinética do perfil histopatológico no coração desses animais e ainda observar o fenótipo de diferentes populações celulares presentes no baço destes animais, bem como a produção de óxido nítrico por estas células, e o perfil da produção de citocinas séricas nestes animais. Esse estudo para avaliação da participação da galectina-1 endógena na cinética da infecção por *T. cruzi* poderia responder como essa lectina estaria agindo na resposta imune dos animais infectados, e porque os animais WT apresentaram maior parasitemia e maior índice de mortalidade.

A primeira análise diz respeito à massa dos baços dos diferentes animais infectados, uma vez que o baço é um dos principais órgãos linfóides secundários recrutados diante de uma infecção como a provocada pelo *T. cruzi* (DE MEIS *et al.*, 2009; GUARNER *et al.*, 2001), na maioria das vezes provocando o seu aumento de volume. Os baços dos camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 infectados foram então removidos cirurgicamente e pesados em balança semi-analítica nos dias 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção, e a diferença entre as massas dos órgãos encontra-se na Figura 8. Nota-se um aumento significativo na massa dos baços dos animais de ambos os grupos, de acordo com o curso da infecção (até o 14º dia), seguido de uma diminuição nessa massa com o início na fase crônica (21º. e 28º. dias) e consequente controle da infecção aguda. Nota-se também uma diferença significativa entre a massa dos baços dos animais WT e a dos animais KO Gal-1 ($P < 0,05$) no 14º dia pós-infecção, sendo a primeira superior que a segunda (Figura 8). Esse aumento do volume dos baços de acordo com

Figura 8 – Análise morfológica do baço de animais infectados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tiveram seus baços removidos em diferentes dias após a infecção. Os valores da massa dos baços dos animais são apresentados em gramas. Foram utilizados 5 animais para cada grupo. Nota-se um aumento acentuado no tamanho do órgão de animais selvagens (Gal-1^{+/+}) infectados em relação aos animais KO Gal-1 (*P<0.05). A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) “two-way”, seguida de pós-teste de Bonferroni.

o curso da infecção pode ser dar pelo maior recrutamento de células provenientes dos órgãos linfóides primários, e consequente ativação e proliferação destas células nos órgãos linfóides secundários, entre eles o baço.

4.3.3 Produção sérica de citocinas em animais infectados por *T. cruzi*

Para melhor entender a participação da galectina-1 endógena na resposta a *T. cruzi*, procedeu-se a quantificação de algumas citocinas séricas nestes animais. Os soros de camundongos C57BL/6 destituídos ($\text{Gal-1}^{-/-}$) ou não ($\text{Gal-1}^{+/+}$) do gene da galectina-1 infectados com *T. cruzi* e sacrificados nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-infecção, bem como o soro de animais controles não-infectados, foram utilizados na quantificação de IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 por ELISA, cujos resultados encontram-se na Figura 9.

Primeiramente, notamos que os animais $\text{Gal-1}^{-/-}$ não-infectados apresentam níveis séricos de IFN- γ superiores em relação aos animais não-infectados selvagens (Figura 9A), montando um cenário provavelmente desfavorável para o estabelecimento da infecção. Há também um aumento na concentração sérica de IFN- γ no início da infecção por *T. cruzi* em ambos os grupos. Com 14 dias, notamos uma queda na concentração desta citocina, seguida de um aumento no soro dos animais selvagens com 21 dias de infecção, aumento esse não observado nos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$ ($P < 0,001$). Por fim, a concentração de IFN- γ cai drasticamente no soro dos animais selvagens com 28 dias de infecção. Já nos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$ a concentração desta citocina permanece relativamente estável de 14 até 28 dias após a infecção, após o pico inicial atingido com 7 dias. O IFN- γ é uma citocina associada à resposta T_H1 importante no controle da infecção por *T. cruzi* (GALVÃO DA SILVA *et al.*, 2003; MICHAILOWSKY *et al.*, 2001; LYKENS *et al.*, 2010). Outras citocinas presentes nos animais infectados também estimulam a produção de IFN- γ , como é o caso da IL-12 (GALVÃO DA SILVA *et al.*, 2003; MICHAILOWSKY *et al.*, 2001). É provável, portanto, que a maior produção de IL-12 pelos animais selvagens (Figura 9B) esteja relacionada com os maiores níveis de IFN- γ sérico encontrados nestes animais. Ainda, o padrão de expressão de IFN- γ nos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$ e selvagens, infectados ou não, apresentou diferenças significativas. Assim, sugerimos que o animal $\text{Gal-1}^{-/-}$ seria mais eficiente na eliminação do parasita, já que mesmo antes da infecção apresentava níveis aumentados de IFN- γ sérico.

Assim como demonstrado para IFN- γ , detectamos nos animais Gal-1^{-/-} não-infectados níveis séricos de IL-12 superiores aos encontrados nos animais selvagens não-infectados. Isto pode favorecer uma resposta inicial mais eficiente contra o parasita nos animais Gal-1^{-/-}. Pudemos notar ainda que os animais selvagens infectados com *T. cruzi* têm uma concentração sérica de IL-12 maior do que os animais Gal-1^{-/-} nos dias 7, 14 e 28 pós-infecção (Figura 9B). A IL-12 é uma citocina da resposta de padrão T_H1, sendo a principal citocina promotora de resistência a patógenos da resposta imunológica inata, independente de células T (GAZZINELLI *et al.*, 1994; TRIPP *et al.*, 1994), estimuladora de células NK (KOBAYASHI *et al.*, 1989) e fundamental no controle da infecção por *T. cruzi*: animais IL-12 KO são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (BASTOS *et al.*, 2002; GALVÃO DA SILVA *et al.*, 2003). IL-12 também é importante na polarização da resposta imunológica adaptativa mediada por linfócitos (SYPEK, *et al.*, 1993; GAZZINELLI *et al.*, 1994). Na Figura 9B pode-se notar que, apesar das concentrações de IL-12 no soro de animais selvagens serem maiores do que nos animais Gal-1^{-/-} na maioria dos dias avaliados, essa diferença é muito pequena, e até se inverte no 14º dia pós-infecção. Além disso, a presença desta citocina nos animais selvagens não auxiliou no controle da replicação de *T. cruzi*, uma vez que estes animais apresentaram maior parasitemia e mortalidade, em relação aos animais Gal-1^{-/-}.

Também foi feita a dosagem de TNF- α no soro dos animais infectados, cujo resultado encontra-se na Figura 9C. Nota-se que os animais selvagens têm uma concentração maior de TNF- α do que os animais Gal-1^{-/-} no 7º dia de infecção. Porém, essa diferença não é observada nos demais pontos analisados, em que os animais Gal-1^{-/-} apresentam uma concentração sérica de TNF- α parecida com a dos animais selvagens (Figura 9C). O TNF- α é uma citocina inflamatória que é produzida durante a infecção por *T. cruzi* (TARLETON *et al.*, 1988), contribui para a atividade tripanocida (DE TITTO *et al.*, 1986; PLAYFAIR & TAVERNE, 1987) e resistência à infecção (SILVA *et al.*, 1995). Porém, sua produção excessiva durante a infecção pode contribuir a uma maior susceptibilidade ao parasito (RUSSO *et al.*, 1989; STAROBINAS *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2001), induzir caquexia (TRUYENS *et al.*, 1995), choque e morte dos animais infectados (STAROBINAS *et al.*, 1991; HOLSCHER *et al.*, 2000).

Na observação do curso da infecção por *T. cruzi*, os camundongos selvagens apresentaram uma maior mortalidade (100% em 15 dias de infecção) em relação aos animais Gal-1^{-/-}, e a alta concentração de TNF- α encontrada no soro desses animais no 7º dia pós-infecção pode ter cooperado com a baixa taxa de sobrevivência desse grupo de animais. No entanto, estes mesmos animais selvagens apresentaram uma maior parasitemia em relação aos animais Gal-1^{-/-}, o que indica que o TNF- α não auxiliou no controle destes parasitas.

O resultado da dosagem de IL-4 nos soro dos animais selvagens e Gal-1^{-/-} infectados com *T. cruzi* encontra-se na Figura 9D. Nota-se que os animais selvagens apresentaram uma concentração sérica de IL-4 maior que a dos animais Gal-1^{-/-} no 7º dia pós-infecção. No 21º dia de infecção essa diferença se mantém, com os animais selvagens apresentando maior concentração sérica de IL-4. Por fim, nos dias 14 e 28 pós-infecção essa citocina não foi detectada em nenhum dos soros testados. A IL-4 é uma citocina de padrão T_H2 que, associada com IL-10, pode inibir a atividade citotóxica de macrófagos (OSWALD *et al.*, 1992). Além disso, tratamento de camundongos infectados com *T. cruzi* com anticorpos anti-IL-4 pode diminuir a parasitemia na fase aguda, e/ou aumentar a sobrevivência dos animais infectados (TORRECILHAS *et al.*, 2009; ABRAHAMSON *et al.*, 2000). Ainda, animais tratados com IL-4 e IL-10 recombinantes tiveram aumento do parasitismo e supressão da produção de IFN- γ (ABRAHAMSON *et al.*, 2000). Animais com níveis elevados de IL-4 seriam, portanto, mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi*. A presença de galectina-1 endógena pode favorecer, portanto, uma resposta T_H2 (MOTRAN *et al.*, 2008), diante da infecção por *T. cruzi*, dado o aumento da concentração sérica de IL-4 encontrada nos animais selvagens infectados nos 7º e 21º dia, o que tornaria estes animais mais susceptíveis à infecção com *T. cruzi* que os animais Gal-1^{-/-}.

A dosagem de IL-10 também foi feita nos camundongos selvagens e Gal-1^{-/-}, como mostra a Figura 9E. Podemos observar que os animais selvagens apresentam uma concentração sérica de IL-10 mais elevada que a dos animais Gal-1^{-/-} no 7º dia após a infecção com *T. cruzi*. Nos demais dias de infecção, essa citocina não foi detectada em nenhum dos soros testados. IL-10 é uma citocina de padrão T_H2, com atividade imunorregulatória, que pode levar à susceptibilidade ao parasita quando produzida durante a infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992; REED *et al.*, 1994), inibindo a atividade tripanocida dos macrófagos estimulados com IFN- γ (SILVA *et al.*, 1992). Animais IL-10 KO apresentam menor parasitemia e parasitismo

nos tecidos, além de um aumento na produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ (ABRAHAMSON & COFFMAN, 1996; HUNTER *et al.*, 1997). No entanto, IL-10 também é importante no controle do processo de inflamação, já que animais IL-10 KO infectados apresentam maior mortalidade (HUNTER *et al.*, 1997). Dados recentes da literatura mostram que galectina-1 induz a produção de IL-10 e atenua o IFN- γ produzido por linfócitos T ativados (STOWELL *et al.*, 2008; VAN DER LEIJ *et al.*, 2004). Como os animais selvagens apresentaram alta concentração de IL-10 no 7º dia de infecção (Figura 9E) e uma alta taxa de parasitemia e mortalidade, sugere-se a imunossupressão induzida por Gal-1 por meio da produção de IL-10 aumentada (STOWELL *et al.*, 2008) como um mecanismo para a susceptibilidade dos animais selvagens infectados com *T. cruzi*, em relação aos animais Gal-1^{-/-}.

Em conjunto, os dados obtidos pela dosagem de citocinas revelam que os animais selvagens infectados com *T. cruzi* têm uma maior concentração sérica de IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-12 e TNF- α , diferente dos animais Gal-1^{-/-}. A galectina-1 endógena pode contribuir para o estabelecimento desse ambiente imunomodulado, já que é uma lectina que favorece o estabelecimento de um padrão de resposta T_H2 (MOTRAN *et al.*, 2008; STOWELL *et al.*, 2008). A imunossupressão desencadeada por IL-10, em associação a IL-4 e a citocina pró-inflamatória TNF- α , pode explicar a maior susceptibilidade dos animais selvagens infectados com *T. cruzi*, em relação aos animais Gal-1^{-/-} infectados. Finalmente, entendemos que a ausência da Gal-1 endógena promove um balanço nos componentes das respostas imunológicas inata e adaptativa, favorecendo a resolução da infecção experimental aguda por *T. cruzi*.

Figura 9 – Avaliação do impacto da Gal-1 endógena na produção de citocinas por animais infectados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 destituídos ($\text{Gal-1}^{-/-}$) ou não ($\text{Gal-1}^{+/+}$) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tiveram seus soros coletados nos dias 9 e 14 pós-infecção para a determinação de diferentes citocinas. Os valores das concentrações de citocinas são apresentados em pg de citocina/mL de soro. Foram utilizados soros de 3 animais para cada grupo, inclusive os controles não-infectados (NI). **A** – quantificação de IFN γ , **B** – IL-12, **C** – TNF α , **D** – IL-4, e **E** – IL-10.

4.3.4 Análise fenotípica das populações celulares do baço de animais infectados por *T. cruzi*

Diante dos resultados obtidos para a dosagem de citocinas no soro dos animais selvagens e Gal-1^{-/-} infectados, optou-se por avaliar o perfil das células imunológicas presentes no baço destes animais, de forma a entender melhor os mecanismos envolvidos na maior susceptibilidade de animais selvagens a *T. cruzi*. Sendo o baço um dos principais órgãos linfóides secundários recrutados na infecção por *T. cruzi*, camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Cinco indivíduos de cada grupo foram devidamente anestesiados e eutanasiados em quatro diferentes períodos de tempos para análise do perfil das células presentes nos baços destes animais: 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção. As células desses animais e dos respectivos animais controles não-infectados foram retiradas do baço, lavadas, contadas e incubadas com os diferentes anticorpos para imunofenotipagem por citometria de fluxo, cujos resultados encontram-se nas Figuras 10 e 11.

Primeiramente, na marcação de células T (CD45RB+) CD4+ (*helper*), notamos que no 7º dia pós-infecção os animais selvagens têm uma maior porcentagem destas células do que os animais Gal-1^{-/-} (Figura 10). Já no 14º dia ambos os grupos apresentam uma redução nessa população celular, que aumenta no 21º dia e volta a cair no 28º dia pós-infecção. Apesar dessa oscilação na população de T CD4+ ocorrer em ambos os grupos de animais infectados, os animais selvagens, em todos os dias avaliados, apresentam maior porcentagem dessas células, em relação aos animais Gal-1^{-/-}.

Uma situação semelhante ocorre com a marcação de células T CD4+ ativadas (CD44+). Desde o 7º dia de infecção, os animais selvagens infectados com *T. cruzi* apresentam maior porcentagem de população destas células, quando comparados com os animais Gal-1^{-/-}. No 14º dia, a população de T CD4+CD44+ dos animais selvagens sobe ainda mais, enquanto que a porcentagem destas células nos animais Gal-1^{-/-} sofre uma queda. O mesmo ocorre no 21º dia pós-infecção. Já no 28º dia, a população de células T CD4+CD44+ dos animais selvagens permanece estável, enquanto que a população proveniente dos animais Gal-1^{-/-} tem um pequeno aumento. Nestes três pontos seguidos (14º, 21º e 28º dias pós-infecção), a diferença na porcentagem de células T CD4+CD44+ nos animais

selvagens é significativamente maior ($P < 0,05$) em relação aos animais Gal-1^{-/-}. Sabe-se que células T CD4⁺ de padrão T_H1 e secretoras de IFN- γ , são importantes no controle de infecções causadas por parasitas intracelulares, entre eles o *T. cruzi* (HOFT *et al*, 2000). Também é relatado que galectina-1 atua promovendo uma resposta T_H2, em detrimento de uma resposta T_H1 (MOTRAN *et al.*, 2008). De forma interessante, os animais selvagens infectados apresentaram maiores números de células T CD4⁺ e T CD4⁺CD44⁺ do que os animais Gal-1^{-/-} durante o curso da infecção por *T. cruzi*. Os animais selvagens apresentaram também maior parasitemia (Figura 6) do que os animais Gal-1^{-/-}. Talvez essa maior carga parasitária circulante tenha estimulado um maior recrutamento e ativação de células T CD4⁺ de forma a tentar combater esse parasita. A galectina-1, neste caso, poderia estar mais envolvida com os passos iniciais da infecção (como a entrada do parasita nos macrófagos peritoneais ou na liberação das formas tripomastigotas dessas células). Associado a este fato, os animais Gal-1^{-/-} podem, frente à infecção por *T. cruzi*, apresentar um balanço Th1/Th2 favorecedor à eliminação do parasita, diferentemente dos animais selvagens.

Também observou-se o comportamento da população de células T (CD45RB⁺) CD8⁺ nos animais selvagens e Gal-1^{-/-} infectados com *T. cruzi* (Figura 10). Podemos notar que no 7º dia pós-infecção não há muita diferença entre o número destas células entre os grupos. No 14º dia, no entanto, a população de T CD8⁺ nos animais selvagens sofre um aumento, enquanto que nos animais Gal-1^{-/-} essa população declina. No 21º dia, a porcentagem destas células continua a subir nos animais selvagens, sendo acompanhada de um aumento no grupo de animais Gal-1^{-/-}. Já no 28º dia, ambas as populações sofrem uma queda, porém o número de células T CD8⁺ nos animais selvagens permanece maior em relação aos animais Gal-1^{-/-}.

A população de células T CD8⁺ ativadas (CD44⁺) também foi analisada (Figura 10). Nos dias 7 e 14 após a infecção, não há muita diferença entre os grupos selvagem e Gal-1^{-/-} em relação à porcentagem dessa população celular. No 21º dia, no entanto, a porcentagem de células T CD8⁺ em ambos os grupos tem um aumento, sendo que a porcentagem de células nos animais selvagens

Figura 10 – Avaliação do envolvimento da Gal-1 endógena no fenótipo de células T esplênicas de animais infectados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 destituídos ($Gal-1^{-/-}$) ou não ($Gal-1^{+/+}$) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tiveram diferentes células de baço imunofenotipadas por citometria de fluxo. Os valores das células marcadas são apresentados em porcentagem de células relativa aos linfócitos totais. Foram utilizados células provenientes de 5 animal para cada grupo, com exceção dos controles não-infectados, onde foi usado apenas 1 animal por dia. Os pontos assinalados (*) representam uma diferença significativa entre dois grupos ($P < 0,05$).

é maior do que nos animais Gal-1^{-/-} infectados. Por fim, no 28º dia, essa população celular, nos animais selvagens, sofre uma pequena queda, enquanto que, nos animais Gal-1^{-/-}, há um novo aumento. Células T CD8⁺ também são importantes no controle da infecção por *T. cruzi* (MARTIN & TARLETON, 2004; LANNES-VIEIRA, 2003), principalmente na eliminação de células infectadas, porém podem levar ao desenvolvimento de inflamação no tecido cardíaco (TROCOLI-TORRECILHAS *et al.*, 2009). Recentemente (LIU *et al.*, 2009), foi descrito que galectina-1, produzida pelas próprias células T CD8⁺ periféricas ativadas, age como um regulador negativo autócrino destas células, diminuindo a ligação de moléculas ao TCR, a transdução de sinal e o *burst*. Assim, se galectina-1 age favorecendo uma resposta T_H2, que por sua vez levaria a um ambiente desfavorável para a ativação de células T CD8⁺, era de se esperar que houvesse menor número destas células em animais selvagens infectados, do que em animais Gal-1^{-/-}. No entanto, o contrário ocorreu diante da infecção por *T. cruzi*: animais selvagens apresentaram um maior número de células T CD8⁺ e TCD8⁺CD44⁺ do que os animais Gal-1^{-/-}. Novamente, a participação de galectina-1 endógena deve ser mais significativa nos estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*, o que pode influenciar a montagem da resposta imune adaptativa. Animais Gal-1^{-/-} devem controlar melhor a entrada do parasita nos macrófagos e devem ser mais eficientes em destruí-lo. Um reflexo disso seria o fato de que animais Gal-1^{-/-} apresentaram menor parasitemia em relação aos animais selvagens. A alta carga de parasitas circulantes pode ter levado à maior ativação e recrutamento de células T CD8⁺ em animais selvagens, o que não se verificou com tanta intensidade nos animais Gal-1^{-/-}.

Outra população de células T foi analisada: células T CD4⁺CD25⁺. Podemos observar (Figura 10) que o comportamento do perfil dessa população é semelhante em ambos os grupos de animais infectados. No 7º dia de infecção, não há muita diferença entre os grupos, em relação a essa população celular, apesar dos animais selvagens apresentarem uma porcentagem um pouco maior do que os animais Gal-1^{-/-}. No 14º dia, a população de células T CD4⁺CD25⁺ em ambos os grupos sofre uma queda, seguida de um aumento no 21º dia, e de um novo aumento no 28º dia pós-infecção. Deve-se frisar também que, durante todo o período analisado, a população de células T CD4⁺CD25⁺ nos animais selvagens se manteve superior em relação aos animais Gal-1^{-/-}, principalmente no 21º dia após a infecção. Trabalhos

recentes têm mostrado a importância de células T CD4+CD25+ no controle da infecção por *T. cruzi* (MARIANO *et al.*, 2008; SALES *et al.*, 2008): estas células teriam uma atuação limitada no controle desse parasita, porém, quando as células T CD4+CD25+ são depletadas pela adição de anticorpos anti-CD25, por exemplo, a resposta inflamatória ao *T. cruzi* é muito mais intensa (MARIANO *et al.*, 2008). Galectina-1 foi descrita como fundamental na regulação mediada por T CD4+CD25+ (GARÍN *et al.*, 2007): Células CD4+CD25+ provenientes de animais deficientes do gene da Gal-1 ou células T CD4+CD25+ destituídas do RNA mensageiro para essa lectina apresentaram menores atividades regulatórias em comparação a células provenientes de animais selvagens. Na Figura 10, ao longo do curso da infecção por *T. cruzi*, pode-se observar que animais selvagens apresentam maior porcentagem de células T CD4+CD25+ do que animais Gal-1^{-/-}. É interessante observar, porém, que o dia em que se tem a maior porcentagem de células T CD4+CD25+, tanto no grupo dos animais selvagens como dos animais Gal-1^{-/-}, é no 21º dia após a infecção (Figura 10). Até esse dia, as populações de T CD4+ e de T CD8+ vão aumentando em ambos os grupos. Depois da população de células T CD4+CD25+ ter atingido seu pico, há uma queda nas populações de T CD4+ e de T CD8+ em ambos os grupos de animais no 28º dia de infecção. Pode ser um indício da regulação da resposta mediado pelas células T CD4+CD25+. Ainda assim, animais selvagens apresentaram maior número de células T CD4+ e T CD8+ em relação aos animais Gal-1^{-/-}. Esse conjunto de resultados sugere que estas células podem ter um papel limitado no contexto da infecção por *T. cruzi*, como demonstrado por Mariano e colaboradores, 2008. Por fim, a menor quantidade de células T CD4+CD25+ nos animais Gal-1^{-/-} pode ser decorrente de uma menor carga parasitária nestes animais.

Além dos linfócitos T, foram analisadas as diferenças entre os perfis de outras populações de células imunológicas, entre os animais selvagens e Gal-1^{-/-} infectados com *T. cruzi* (Figura 11), como os linfócitos B (CD19+). No 7º dia após a infecção, a porcentagens destes linfócitos em ambos os grupos de animais é semelhante. No entanto, no 14º dia, há um aumento de células B no grupo dos animais selvagens, enquanto que nos animais Gal-1^{-/-} a porcentagem dessa população celular tem uma grande queda. Após 21 dias de infecção, há uma pequena queda destas células nos animais Gal-1^{-/-}, porém entre os animais selvagens essa queda é mais acentuada. Na análise fenotípica por esses três dias consecutivos, a população de células B nos animais selvagens permanece maior entre os animais selvagens. Já no 28º dia pós-

infecção, de forma interessante, a situação se inverte: a população de linfócitos B nos animais selvagens tem mais um pequeno declínio, enquanto que nos animais Gal-1^{-/-} essas células têm um aumento, chegando a uma porcentagem maior em relação aos animais selvagens. É conhecido que células B têm grande importância no controle do *T. cruzi* (KIERSENBAUM & HOWARD, 1976; CORSINI *et al.*, 1982) ou mesmo como células produtoras de citocinas (MONTES *et al.*, 2006). Porém, após a expansão policlonal destas células diante da infecção por *T. cruzi*, há uma diminuição de seu número, como forma de controle dessa resposta exacerbada (DE MEIS *et al.*, 2009; ZUNIGA *et al.*, 2000). Isso pode ser observado nos animais selvagens infectados, porém não ocorre nos animais Gal-1^{-/-}, que apresentam uma queda das células B CD19+ desde o 14º dia após a infecção. Recentes relatos na literatura apontam que galectina-1 é importante na maturação de células B (ESPELI *et al.*, 2009; GAUTHIER *et al.*, 2002). Devido à ausência dessa lectina endógena, animais Gal-1^{-/-} podem ter sua expansão de células B prejudicada, mesmo diante de um estímulo infeccioso como o *T. cruzi*. Dessa forma, mesmo com o aumento do baço observado em ambos os grupos de animais infectados, animais Gal-1^{-/-} não teriam uma resposta de células B satisfatória contra esse parasita.

A população de células dendríticas (CD11c+CD86+) no baço destes animais também foi analisada (Figura 11). Podemos observar que no 7º dia após a infecção, a população de células dendríticas é um pouco maior nos animais selvagens do que nos animais Gal-1^{-/-}. No 14º dia, essa população sofre um pequeno declínio em ambos os grupos, mas a proporção é mantida. Já no 21º dia ocorre um fenômeno interessante: há um aumento de células dendríticas nos animais selvagens, enquanto ocorre um declínio dessa população nos animais Gal-1^{-/-} e, nesse dia, a diferença dessa população celular entre os grupos é significativa ($P < 0,05$). No 28º dia, no entanto, a porcentagens de células dendríticas entre os animais selvagens cai, enquanto que aumenta nos animais Gal-1^{-/-}, atingindo valores semelhantes entre os grupos. As células dendríticas são células bastante importantes no controle da imunidade (FULCHER *et al.*, 2006; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). As células dendríticas são ativadas quando entram em contato com antígenos do parasita, e dessa forma passam a ativar outras células, como células T (FULCHER *et al.*, 2006; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998) e estão envolvidas na resposta imunológica diante da infecção por *T. cruzi* (PONCINI *et al.*, 2008; TARLETON, 2007). Foi demonstrado que durante a infecção aguda por *T. cruzi* há um aumento de células

dendríticas no baço dos animais, com o declínio dessas células quando a doença avança para a fase crônica (CHAUSSABEL *et al.*, 2003). Células dendríticas humanas estimuladas com proteínas provenientes de *T. cruzi* são ativadas e passam a expressar marcadores de ativação de superfície, bem como secretar IL-12 e TNF- α . (CUELLAR *et al.*, 2008). Porém, células dendríticas também podem exibir caráter tolerogênico (PERONE *et al.*, 2006). O envolvimento da galectina-1 na atividade de células dendríticas tem sido descrito recentemente (FULCHER *et al.*, 2009, 2006; PERONE *et al.*, 2006). Trabalhos mostram que galectina-1 ativa células dendríticas humanas e aumenta sua migração através da matriz extracelular (FULCHER *et al.*, 2009, 2006), e que células dendríticas que expressam galectina-1 transgênica retardam o estabelecimento de diabetes autoimune em camundongos (PERONE *et al.*, 2006), exercendo função regulatória sobre células T CD4⁺ ativadas secretoras de IFN- γ . Se a alta expressão de galectina-1 transgênica confere às células dendríticas esse papel imunorregulatório, é possível que células dendríticas provenientes de animais selvagens tenham um caráter imunomodulatório maior, quando comparadas a células dendríticas de animais Gal-1^{-/-}. Foi observado que animais selvagens apresentaram um pico de células dendríticas no 21º dia pós-infecção, e que animais Gal-1^{-/-} mantiveram sua porcentagem de células relativamente estável durante o curso da infecção, atingindo na maioria das vezes, porcentagens menores do que os animais selvagens. Dessa forma, poderíamos supor que esse aumento de células dendríticas em animais selvagens seria uma tentativa de controlar a infecção e inflamação sofrida por esses animais, enquanto que, nos animais Gal-1^{-/-}, esse estímulo para sua multiplicação seria menor (pois tais animais tiveram menor carga parasitária no sangue, Figura 6).

eira interessante apresentou um perfil

Figura 11 – Avaliação do envolvimento da Gal-1 endógena no fenótipo de diferentes populações celulares esplênicas de animais infectados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 destituídos ($Gal-1^{-/-}$) ou não ($Gal-1^{+/+}$) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tiveram diferentes células de baço imunofenotipadas por citometria de fluxo. Os valores das células marcadas são apresentados em porcentagem de células relativa aos linfócitos totais, com exceção de F4/80+Mac-3+ e CD11c+CD86+, cuja porcentagem corresponde a células mononucleares. Foram utilizados células provenientes de 5 animal para cada grupo, com exceção dos controles não-infectados, onde foi usado apenas 1 animal por dia. Os pontos assinalados (*) representam uma diferença significativa entre dois grupos ($P < 0,05$).

parecido com o das células dendríticas no decorrer da infecção por *T. cruzi* foi a dos macrófagos (F4/80+Mac-3+, Figura 11). Passados sete dias após a infecção, a porcentagem dessas células entre os dois grupos analisados foi semelhante. Já no 14º dia há um aumento nos macrófagos no grupo de animais selvagens, enquanto há uma pequena queda nessa população entre os animais Gal-1^{-/-}. No 21º dia, essa diferença se acentua: há um maior aumento de macrófagos entre os animais selvagens, e mais uma pequena redução dessas células nos animais Gal-1^{-/-}. Por fim, no 28º dia, há uma queda nessa população celular nos animais selvagens, atingindo valores parecidos em relação aos animais Gal-1^{-/-}. Os macrófagos são células de grande importância na defesa do hospedeiro contra a infecção por *T. cruzi*, principalmente em sua fase aguda (MELO, 2009). Por ser uma célula residente em diversos tecidos, está presente tanto nos sítios de infecção de *T. cruzi* pelo vetor (derme), como na cavidade peritoneal, local da infecção experimental utilizado nesse modelo murino, e representa a primeira linha de defesa celular contra essa parasita (MELO, 2009). O controle da replicação de *T. cruzi* pelos macrófagos se dá pela produção de espécie reativas de oxigênio e nitrogênio, entre elas o óxido nítrico (NO), induzida principalmente na presença de IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 2006; MELO, 2009). Dados da literatura reportam o papel da galectina-1 na fisiologia dos macrófagos (ZUNIGA *et al.*, 2001a; CORREA *et al.*, 2003). A presença de galectina-1 exógena diminui a produção de NO e a expressão de óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) em macrófagos estimulados por IFN- γ , favorecendo, por outro lado, a via da L-arginase (CORREA *et al.*, 2003). Já no tratamento de macrófagos infectados por *T. cruzi* com concentrações crescentes de galectina-1, observou-se que uma baixa concentração de Gal-1 favorece a replicação do parasita, enquanto que altas concentrações dessa lectina induzem a apoptose de macrófagos e a inibição da replicação desse parasita (ZUNIGA *et al.*, 2001a). Este mesmo trabalho (ZUNIGA *et al.*, 2001a) mostra que galectina-1 endógena sofre um aumento de sua expressão em células J774 infectadas, e em macrófagos de animais infectados. Portanto, podemos dizer que galectina-1 desfavorece o controle da infecção por *T. cruzi* por macrófagos, pois leva a uma menor produção de NO, e uma baixa concentração desta espécie reativa de nitrogênio pode favorecer a replicação do parasita nestas células (ZUNIGA *et al.*, 2001a; CORREA *et al.*, 2003). Considerando esses relatos da literatura, poderíamos sugerir que o aumento da população de macrófagos nos camundongos selvagens

durante o curso da infecção por *T. cruzi* seria uma maneira do sistema imunológico destes animais tentar controlar a população desse parasita, que se apresentou maior do que na população nos animais Gal-1^{-/-}. Nos animais Gal-1^{-/-}, por sua vez, a ausência de galectina-1 endógena deve favorecer o controle do parasita pelos macrófagos, desde o momento da infecção na cavidade peritoneal, já que a população dessa célula permanece pouco alterada durante a evolução da infecção (Figura 11), em comparação com os animais selvagens. Esse melhor controle do parasita pelos animais Gal-1^{-/-} também se reflete numa menor parasitemia (Figura 6), além da ausência de mortalidade (Figura 7).

Analizamos também o perfil populacional das células NKT (CD3+NK1.1+) entre os animais selvagens e Gal-1^{-/-} infectados com *T. cruzi* (Figura 11). Já no 7º dia encontramos uma diferença dessa população celular entre os dois grupos, sendo que a população nos animais selvagens é superior a dos animais Gal-1^{-/-}. No 14º dia há um aumento de células NKT em ambos os grupos, porém o aumento no grupo de animais Gal-1^{-/-} é mais acentuado. Com 21 dias de infecção, a população de células NKT nos animais selvagens se mantém estável, enquanto que sofre uma queda nos animais Gal-1^{-/-}. No 28º dia, observa-se um declínio dessa população celular em ambos os grupos. Nota-se também que, durante todo o período analisado, a população de células NKT entre os animais selvagens permanece maior em relação aos animais Gal-1^{-/-}. Células NKT também têm seu papel no controle da infecção por *T. cruzi* (DUTHIE *et al.*, 2005; ANTUNÉZ *et al.*, 2004; SARDINHA *et al.*, 2006; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2006). Duthie *et al.*, em 2005, relataram uma interessante relação entre diferentes células NKT diante da infecção por *T. cruzi*: Animais CD1d-KO, os quais não possuem células NKT invariáveis (iNKT) ou variáveis (vNKT), apresentam uma leve resposta inflamatória à infecção por *T. cruzi*, com presença de infiltrado inflamatório no baço, fígado e músculo. Já animais Jα18-KO, que não possuem iNKT, mas têm vNKT, apresentaram uma resposta inflamatória muito mais violenta nos mesmos órgãos, além de altos níveis de TNF-α, IFN-γ e NO, além de apresentarem maior mortalidade. Tais autores sugerem, portanto, que as células iNKT regulam a resposta exacerbada provocada por células vNKT diante desse modelo de infecção (DUTHIE *et al.*, 2005). Não são encontrados na literatura dados sobre o papel de galectina-1 sobre as células NKT, ou ainda sobre suas diferentes sub-populações. No entanto, estas células são mais abundantes nos animais selvagens infectados com *T. cruzi* do que nos animais Gal-1^{-/-}. Além disso, os

animais selvagens infectados apresentaram um perfil inflamatório exacerbado parecido com os animais $\text{J}\alpha 18\text{-KO}$ analisados por Duthie *et al.*, 2005: maiores níveis de $\text{TNF-}\alpha$, óxido nítrico (como veremos adiante) e maior taxa de mortalidade. Levando esses relatos em consideração, podemos supor que, dentre o perfil das células NKT encontradas em animais selvagens, sua maioria seja de células vNKT em detrimento às iNKT, o que levaria a essa resposta exacerbada contra o parasita. Animais $\text{Gal-1}^{-/-}$, por sua vez, teriam um melhor balanço entre células iNKT e vNKT, o que explicaria seu melhor controle do parasitismo e menor perfil inflamatório. É claro que, no momento, essa seria apenas uma hipótese para relacionar as diferenças entre as porcentagens de NKT entre os animais selvagens e $\text{Gal-1}^{-/-}$ infectados com *T. cruzi*, bem como seus diferentes perfis de resposta contra esse parasita. Além disso, animais selvagens tiveram uma maior carga parasitária sistêmica do que os animais $\text{Gal-1}^{-/-}$ (Figura 6) e, portanto, o recrutamento e ativação de células NKT pode ter sido maior em animais selvagens. Uma imunofenotipagem adequada destas células NKT (CD3+NK1.1+), tentando distinguir as populações de iNKT e vNKT nos animais selvagens e $\text{Gal-1}^{-/-}$ auxiliaria no melhor entendimento da participação de galectina-1 endógena na atividade destas duas sub-populações de células NKT.

Finalmente, analisou-se o fenótipo populacional de células NK (NK1.1+) entre os animais selvagens e $\text{Gal-1}^{-/-}$ diante da infecção por *T. cruzi* (Figura 11). No 7º dia de infecção, os animais selvagens apresentam uma porcentagem de células NK superior à dos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$. No 14º dia há um aumento dessa população celular em ambos os grupos, sendo que entre os animais selvagens esse aumento é mais acentuado. As células NK dos animais selvagens sofrem então um declínio no 21º dia após a infecção, enquanto que nos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$ há um pequeno aumento, e dessa forma as populações celulares dos grupos analisados atinge um valor parecido. Já no 28º dia as células NK dos dois grupos sofrem uma queda, com a porcentagem dos animais selvagens atingindo níveis um pouco superiores que nos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$. As células NK também têm seu papel no controle da infecção por protozoários (KORBEL *et al.*, 2004), especialmente por *T. cruzi* (DUTHIE & KAHN, 2006; LIEKE *et al.*, 2006; SARDINHA *et al.*, 2006; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2006; CARDONI *et al.*, 2000). Por serem células residentes, assim como os macrófagos, representam uma das primeiras linhas de defesa do sistema imunológico contra agentes infecciosos intracelulares, por meio do reconhecimento de células

infectadas via Fas-Fas-L e de sua morte através da liberação de granzimas e perforinas (SMYTH *et al.*, 2005). Um dos mecanismos de resistência à infecção aguda por *T. cruzi* induzidos pelas células NK é a produção de IFN- γ , importante citocina ativadora de resposta imunológica do padrão T_H1 (SARDINHA *et al.*, 2006; CARDONI *et al.*, 2000; CARDILLO *et al.*, 1996). Células NK, no entanto, também têm um papel imunomodulatório importante, já que são bastante encontradas na decídua humana, expressam diversos genes envolvidos na tolerância materno-fetal, e um dos produtos dessa expressão gênica é a galectina-1 (KOPCOW *et al.*, 2008). Vários trabalhos mostram a importância da galectina-1 na imunomodulação necessária para a tolerância materno-fetal (BLOIS *et al.*, 2007; TERNESS *et al.*, 2007). Se galectina-1 é expressa por células NK de forma a controlar a reação imunológica prejudicial materna contra antígenos do feto (KOPCOW *et al.*, 2008), pode-se supor que a presença de galectina-1 endógena favoreça esse papel imunorregulador de células NK nos animais selvagens infectados com *T. cruzi*. Como notamos na Figura 11, animais selvagens apresentam uma maior população de células NK do que os animais Gal-1^{-/-}. Se realmente essas células NK de animais selvagens têm maior caráter imunorregulatório do que nos animais Gal-1^{-/-}, esse aumento de células NK na presença de galectina-1 endógena pode ser um mecanismo de tentar controlar a grande reação inflamatória contra o parasita, mostrada pelo aumento de diversas células envolvidas na resposta inflamatória prejudicial ao parasita, mas também ao hospedeiro.

4.3.5 Dosagem de nitritos

A produção de óxido nítrico (NO) pelas células infectadas por *T. cruzi* é um dos principais mecanismos para o controle da replicação deste parasita (MELO, 2008; COSTA *et al.*, 2006; VESPA *et al.*, 1994; GAZZINELLI *et al.*, 1994). A regulação da produção de NO, portanto, é importante no desenvolvimento de uma maior ou menor susceptibilidade a este parasita (MELO, 2009; SILVA *et al.*, 1995).

Para analisarmos a participação da galectina-1 endógena na produção de óxido nítrico, células de baços dos camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 e infectados com *T. cruzi* foram ressuspensas em meio RPMI-C e acondicionadas em placas estéreis de 12 poços, na concentração de 5x10⁶ células/mL/poço, a fim de se obter sobrenadante de cultura

celular para dosagem de nitritos, metabólito proveniente da produção de óxido nítrico (NO) pelas células. A concentração de nitritos produzidas em 24 e 48 horas de cultura destas células foi determinada através da reação de Griess (GILLIAM *et al.*, 1993; VESPA *et al.*, 1994), e os resultados encontra-se na Figura 12.

Pode-se notar que no 7º dia pós-infecção, células de baço provenientes de animais selvagens produziram significativamente mais NO em 48 horas de cultura ($P < 0,001$), em relação às células dos animais Gal-1^{-/-} cultivadas pelo mesmo período de tempo. Com 14 dias de infecção, as células de animais selvagens têm uma produção de NO significativamente maior ($P < 0,001$) do que as células dos animais Gal-1^{-/-}, tanto em 24 como em 48 horas de cultura. Já com 21 dias de infecção, as células de animais selvagens têm baixa produção de NO, com as células de animais Gal-1^{-/-} apresentando uma maior concentração de nitritos em 48 horas de cultura ($P < 0,001$). Nos outros dias, a diferença na concentração desse metabólito não foi significativa entre os grupos analisados. A infecção por *T. cruzi*, como já foi discutido, leva à ativação de diversos tipos celulares, de forma a tentar eliminar esse parasita. Essa ativação leva a produção de diversas citocinas, entre elas IL-12, IFN- γ e TNF- α (MELO, 2009; SILVA *et al.*, 1995). Tais citocinas, por sua vez, estimulam a produção de óxido nítrico pelo aumento da expressão de enzimas responsáveis por sua produção, entre elas, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MELO, 2009; CUERVO *et al.*, 2008). O envolvimento de galectina-1 na regulação da produção de óxido nítrico já foi relatada. A presença de galectina-1 exógena diminui a produção de NO e a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos estimulados *in vitro* por IFN- γ , favorecendo, por outro lado, a via da L-arginase, uma via alternativa do metabolismo da L-arginina (CORREA *et al.*, 2003). Essa modulação no metabolismo da L-arginina é um dos aspectos que confere à galectina-1 seu caráter antiinflamatório e imunomodulatório. O que é interessante observar é que os animais selvagens infectados com *T. cruzi* tiveram uma produção maior de óxido nítrico em relação aos animais Gal-1^{-/-}. Tal produção pode ter sido estimulada pela maior concentração de TNF- α encontrada no soro dos animais selvagens (Figura 9). No entanto, essa maior produção de NO não conseguiu controlar a replicação do parasita nos animais selvagens, que apresentaram parasitemia maior em relação aos animais Gal-1^{-/-} (Figura 6). Porém, devemos considerar que essa alta produção de NO pelos animais selvagens foi detectada no 14º dia após a infecção, e o pico de parasitemia nestes animais se deu no 9º dia de infecção. Pode-se supor, neste caso,

que a galectina-1 endógena retardou a alta produção de NO nos primeiros dias de infecção, e que ela só se deu após um grande estímulo no sistema imunológico dos animais selvagens: o alto índice de parasitas no sangue, e a alta concentração sérica de TNF- α . Nos animais Gal-1^{-/-}, por sua vez, não foram detectados altos níveis de produção de NO pelas células do baço nos primeiros dias da fase aguda (7^o e 14^o dias pós-infecção), e estes animais apresentaram menores níveis de parasitemia ao longo da infecção (Figura 6). Uma hipótese para esse fenômeno é que o melhor controle da replicação de *T. cruzi* pelos animais Gal-1^{-/-} deve ser dar nos primeiros estágios da infecção, quando as formas tripomastigotas têm contato com os macrófagos peritoneais destes animais. A produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos animais Gal-1^{-/-} deve ser mais eficiente do que nos animais selvagens, uma vez que a presença de galectina-1 desfavorece a geração de NO. A avaliação da produção de NO pelos macrófagos peritoneais de animais selvagens e Gal-1^{-/-} poderia fornecer um melhor embasamento para essa hipótese.

Figura 12 – Participação da Gal-1 endógena na produção de NO por células de baço de animais infectados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e tiveram seus baços removidos em diferentes dias após a infecção e as células cultivadas por 24 e 48h para avaliação da produção de NO, determinada pela concentração de nitritos no sobrenadante das células. Os valores das concentrações de nitritos são apresentados em μM. Foram utilizados 5 animais para cada grupo. **A** – Nitritos produzidos em cultura de 24h. **B** – Nitritos produzidos em cultura de 48h. Nota-se uma diferença significativa entre os animais WT e KO Gal-1 em diferentes dias de infecção (*P<0,001). ND: não-detectado.

4.3.6 Histopatologia e contagem de células do infiltrado inflamatório do tecido cardíaco

Para avaliarmos o envolvimento da glectina-1 endógena na resposta inflamatória no tecido cardíaco, camundongos C57BL/6 destituídos ($\text{Gal-1}^{-/-}$) ou não ($\text{Gal-1}^{+/+}$) do gene da glectina-1 e infectados com *T. cruzi* por 21 dias foram sacrificados e eutanasiados, seus corações removidos cirurgicamente, fixados e processados para análise histopatológica, e os resultados obtidos encontram-se na Figura 13. Os cortes de tecido cardíaco foram corados com hematoxilina e eosina, e as células arredondadas no interstício das fibras do coração foram contadas com auxílio de microscópio óptico e computador *on line*. Avaliando os valores médios de células inflamatórias por campo analisado (Figura 13A), a distribuição da frequência de células por campo (Figura 13B), bem como as fotomicrografias obtidas neste experimento (Figura 13C e D), podemos notar que o infiltrado inflamatório do coração dos animais selvagens é significativamente maior ($P < 0,01$) que nos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$. Diversos trabalhos relatam o estabelecimento da miocardite como um dos principais aspectos da patogenia da infecção por *T. cruzi* (da MATTA GUEDES *et al.*, 2010; PAVANELLI *et al.*, 2010; MELO 2008). O infiltrado inflamatório cardíaco mais intenso, associado à maior concentração de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12 e TNF- α (Figura 9), maior número de células ativadas (Figuras 10 e 11) e maior produção de óxido nítrico pelas células do baço (Figura 12) nos leva a afirmar que os animais selvagens são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* do que os animais $\text{Gal-1}^{-/-}$. Essa informação também se justifica pela observação de maior parasitemia e maior mortalidade dos animais selvagens em relação aos animais $\text{Gal-1}^{-/-}$ (Figuras 6 e 7).

Figura 13 – Animais destituídos do gene da Gal-1 e infectados por *T. cruzi* apresentam uma redução no número de células do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco. Camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene para Gal-1 e infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram eutanasiados no 21º dia de infecção. O número de células inflamatórias representam a média ± EPM da contagem de 10 campos dos corações de 5 animais por grupo. A contagem de células inflamatórias no interstício do tecido cardíaco corado com H&E revela um maior número de infiltrado inflamatório nos animais selvagens em relação àqueles animais KO Gal-1. **B** – Distribuição da frequência da contagem de células infiltradas nos tecidos dos animais WT e KO Gal-1. **C** e **E** – Fotomicrografia ilustrativa dos tecidos dos animais WT e KO Gal-1, onde nota-se a diferença na quantidade de células infiltradas no interstício do tecido cardíaco. A barra no canto inferior direito das fotos representa 50 µm. O método estatístico usado foi o Teste t de Student não-pareado (**P<0.01).

4.4 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na resposta inflamatória no sítio de infecção por *T. cruzi*

4.4.1 Avaliação fenotípica das células recrutadas para o sítio de infecção por *T. cruzi* por citometria de fluxo

Os resultados obtidos até este ponto indicam que os animais selvagens se mostraram mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* do que os animais Gal-1^{-/-}: apresentaram maior parasitemia no pico da infecção (Figura 6), maior índice de mortalidade (Figura 7), maior aumento do baço, importante órgão linfóide secundário (Figura 8), maior aumento de citocinas pró-inflamatórias, de padrão T_H1 e T_H2 (Figura 9), maior número de células T (Figura 10) e outras células inflamatórias ativadas (Figura 11) no baço destes animais, bem como maior produção de óxido nítrico por estas células em cultura (Figura 12) e maior infiltrado inflamatório no tecido cardíaco (Figura 13). No entanto, considerando que este fenótipo de susceptibilidade aumentada estaria de certa forma em desacordo com o já bem descrito caráter imunomodulador da galectina-1 (TOSCANO *et al.*, 2007; MOTRAN *et al.*, 2008; STOWELL *et al.*, 2008), passamos a considerar a hipótese de que os animais Gal-1^{-/-} controlariam melhor a infecção por *T. cruzi* já no sítio de infecção escolhido, a cavidade peritoneal. Alguns trabalhos demonstraram a importância dos primeiros estágios de invasão e infecção no estabelecimento da infecção por *T. cruzi* *in vivo* (CHESSLER *et al.*, 2009). Desta maneira, animais Gal-1^{-/-} eliminariam parte da carga parasitária inoculada num curto período de tempo de maneira mais eficiente que os animais selvagens, o que poderia se refletir num menor número de tripomastigotas infectantes liberados após o primeiro ciclo de replicação nas células do peritônio, levando à maior resistência à infecção por *T. cruzi*. Os camundongos selvagens, por sua vez, não teriam esse controle rápido do primeiro ciclo de replicação ou, ainda, a presença de galectina-1 criaria um ambiente favorável à replicação do *T. cruzi*, o que facilitaria sua replicação e conseqüente disseminação nestes animais.

Para investigar esta hipótese, camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados por via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* e, após 6, 12, 24 e 48 horas de infecção, estes animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta e análise do perfil das

Figura 14 – Participação da Gal-1 endógena no recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção por *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas por via intraperitoneal e tiveram seu exsudato peritoneal coletado para caracterização fenotípica das células recrutadas para essa cavidade após 6, 12, 24 e 48 horas de infecção. Os resultados estão expressos em porcentagem do total de células na cavidade. **A** – Neutrófilos presentes no peritônio. **B** – Macrófagos presentes no peritônio. Nota-se um aumento significativo no número de neutrófilos e macrófagos recrutados para o peritônio entre os grupos WT e KO Gal-1 em tempos de infecção (* $P < 0,05$). A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) “two-way”, seguida de pós-teste de Bonferroni.

células do exsudato peritoneal por citometria de fluxo. As porcentagens de neutrófilos e macrófagos encontrados na cavidade peritoneal dos animais selvagens e Gal-1^{-/-} nos diferentes tempos de infecção encontram-se na Figura 14. Podemos notar um aumento no número de neutrófilos recrutados para a cavidade peritoneal em ambos os grupos já com 6 horas de infecção (Figura 14A). Já com 12 e 24 horas de infecção, a porcentagem destas células continua alta nos dois grupos, porém os animais Gal-1^{-/-} apresentaram um maior número de neutrófilos recrutados em relação aos animais selvagens ($P < 0,05$). Com 48 horas de infecção, a porcentagem de neutrófilos no peritônio já diminuiu bastante, chegando próxima aos valores encontrados para os animais controles não-infectados (NI), não havendo mais diferença entre os grupos.

A porcentagem de macrófagos na cavidade peritoneal dos animais selvagens e Gal-1^{-/-} infectados com *T. cruzi* também foi avaliada (Figura 14B). Notamos que o número destas células aumenta com 6 horas de infecção em relação aos controles não-infectados, e esse aumento é ainda maior com 12 horas de infecção. Já com 24 horas após a inoculação das formas tripomastigotas no peritônio, o número de macrófagos em ambos os grupos começa a decair, porém os animais Gal-1^{-/-} apresentam maior porcentagem destas células em relação aos animais selvagens ($P < 0,05$). Com 48 horas de infecção, as porcentagens de macrófagos na cavidade diminuem mais, não havendo diferença significativa entre os grupos.

Relatos na literatura (COOPER *et al.*, 2008; NORLING *et al.*, 2008; GIL *et al.*, 2006; LA *et al.*, 2003) mostram que Gal-1 dificulta a migração de células através do endotélio, por bloquear/competir com sítios de adesão destas células. Dessa forma, a ausência de galectina-1 endógena facilitaria a migração de fagócitos para o peritônio nos estágios iniciais da infecção, conforme observamos na Figura 14. Uma maior migração das células responsáveis pelo controle do agente infeccioso poderia levar a um melhor controle da replicação de *T. cruzi* ainda no sítio de infecção utilizado neste modelo, o que explicaria o fato dos animais Gal-1^{-/-} serem menos susceptíveis a este parasita do que os animais selvagens.

Como observamos um aumento na população de neutrófilos e macrófagos no peritônio dos animais infectados, poderemos ainda avaliar a participação de cada uma dessas populações de células, isoladamente, na eliminação do *T. cruzi*. Para ensaios *in vitro*, podemos isolar neutrófilos do peritônio (ALVES *et al.*, 2010) de animais selvagens e Gal-1^{-/-} e infectá-los com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Ensaio *in vitro* envolvendo macrófagos podem ainda ser feitos isolando-se essa população celular do peritônio (TALVANI *et al.*, 2009) ou da medula óssea (SILVA *et al.*, 2010) de animais selvagens e Gal-1^{-/-}, e de fato já foram realizados, conforme item 4.5 do presente trabalho. Já ensaios *in vivo* poderiam ser feito depletando-se cada população de célula dos animais, por meio da administração de anticorpos monoclonais específicos para neutrófilos e/ou monócitos (CHEN *et al.*, 2001; MELO & MACHADO, 2001), infectando-se os animais em seguida. Diversos outros desdobramentos destes ensaios sugeridos poderiam auxiliar no entendimento da participação destas células efectoras contra *T. cruzi* no contexto da ausência de galectina-1 endógena.

4.5 Avaliação do envolvimento da galectina-1 endógena na atividade tripanocida de células peritoneais aderentes

4.5.1 Avaliação da liberação de formas tripomastigotas e produção de óxido nítrico por células peritoneais aderentes infectadas com *T. cruzi*

Para avaliar se a maior parasitemia encontrada nos animais selvagens em relação aos animais Gal-1^{-/-} (Figura 6) se deve a diferenças na atividade dos macrófagos peritoneais destes animais, visto que são as primeiras células infectadas pelo *T. cruzi* quando as formas tripomastigotas são injetadas no peritônio (Figura 14), fez-se um ensaio para avaliar a capacidade tripanocida das células aderentes peritoneais *in vitro*. Brevemente, células do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 e elicitadas após a injeção de tioglicolato no peritônio destes animais foram lavadas, colocadas em placa de cultura para adesão e infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e o número de formas liberadas pelos macrófagos nos dias 2, 3, 4 e 5 pós-infecção foi contado em câmara de Neubauer. O número de formas tripomastigotas liberadas por dia pelos diferentes macrófagos, bem como a concentração de nitrito presente no sobrenadante dessas células nos diferentes dias de infecção encontram-se na Figura 15.

Notamos que, até o terceiro dia de infecção, não há uma liberação significativa de tripomastigotas pelos macrófagos provenientes de animais selvagens ou Gal-1^{-/-} (Figura 15A). Já no quarto dia, há aumento na liberação de parasitas

pelos macrófagos de ambos os grupos, sendo que, dentre os macrófagos provenientes de animais selvagens essa liberação é significativamente maior ($P < 0,05$) do que nos animais Gal-1^{-/-}. Essa diferença se mantém no número de parasitas liberados no quinto dia após a infecção, onde os macrófagos selvagens liberaram mais formas tripomastigotas do que os macrófagos Gal-1^{-/-} ($P < 0,01$).

A produção de óxido nítrico em ambos os grupos durante o monitoramento da atividade tripanocida também foi analisada, e os resultados encontram-se na Figura 15B. Podemos notar que há um acúmulo maior de nitrito no sobrenadante de cultura das células provenientes de animais Gal-1^{-/-} em relação aos animais selvagens com dois dias de infecção ($P < 0,001$). Já com três dias de infecção, esse resultado se inverte: o sobrenadante proveniente dos animais selvagens tem maior concentração de nitrito do que o dos animais Gal-1^{-/-} ($P < 0,01$). Por fim, com quatro e cinco dias de infecção, as concentrações de nitrito em ambos os grupos decaíram, e não houve diferença estatística entre as amostras avaliadas.

Relacionando a liberação de tripomastigotas em diferentes dias de infecção com a concentração de nitrito no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais, percebemos que as células provenientes dos animais Gal-1^{-/-} apresentam uma maior produção de óxido nítrico nos primeiros dias de infecção, em relação às células de animais selvagens (Figura 15B). Essa maior produção de óxido nítrico pode estar relacionada com a menor liberação de parasitas pelos macrófagos Gal-1^{-/-} observada com quatro e cinco dias de infecção (Figura 15A). Dessa maneira, os macrófagos Gal-1^{-/-} controlariam melhor a replicação de *T. cruzi* em seu interior pela maior produção de óxido nítrico, metabólito essencial para a morte deste parasita intracelular (COSTA *et al.*, 2006; MELO, 2009). Os macrófagos provenientes dos animais selvagens também produzem óxido nítrico nos primeiros dias de infecção, e esta produção é até maior do que a encontrada para células Gal-1^{-/-} com três dias de infecção (Figura 15B). No entanto, acreditamos que é a produção aumentada de óxido nítrico logo no início da infecção (até dois dias após o contato com o parasita) que melhor controlaria a morte do parasita pelos macrófagos destituídos de galectina-1 endógena, conforme descrito para camundongos C57BL/6 por Costa e colaboradores, 2006.

Sabemos, no entanto, que a produção exacerbada de óxido nítrico por macrófagos, ativados por IFN- γ e/ou TNF- α , durante a infecção por *T. cruzi* pode ser um elemento importante na imunossupressão em camundongos infectados por esse

parasita (ABRAHAMSON & COFFMAN, 1995). Apesar de macrófagos Gal-1^{-/-} produzirem mais óxido nítrico no início da infecção, essa produção não se mantém em todos os outros dias observados, diferentemente dos macrófagos selvagens, que mantém uma produção relativamente alta por mais tempo (Figura 15). Isto pode explicar, pelo menos parcialmente, o melhor controle da infecção por *T. cruzi* pelos animais Gal-1^{-/-}, já que esses animais seriam capazes de produzir uma quantidade adequada de NO para matar o parasita, porém sem causar imunossupressão significativa.

Outro aspecto que poderia explicar a menor liberação de tripomastigotas pelos macrófagos Gal-1^{-/-} seria uma menor adesão e, conseqüentemente, entrada dos parasitas nas células destituídas de galectina-1 endógena. Sabemos que *T. cruzi* apresenta em sua superfície diversos glicoconjugados (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001) e que a infecção por *T. cruzi* aumenta a expressão de diferentes galectinas e seus ligantes (VRAY *et al.*, 2004; ZUNIGA *et al.*, 2001a). A ausência de galectina-1 endógena poderia dificultar e diminuir a interação tripomastigota-macrófago e, com isso, levar a uma menor entrada do parasita nas células fagocíticas. Um menor número de formas tripomastigotas em seu interior, associada a uma maior produção de óxido nítrico pelos macrófagos Gal-1^{-/-} (Figura 15B) explicaria a menor liberação de parasitas por essas células observada no presente trabalho (Figura 15A). A avaliação da adesão de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais selvagens e Gal-1^{-/-}, bem como da inibição dessa adesão por glicanas com alta afinidade para galectina-1 (EARL *et al.*, 2010) poderia confirmar essa hipótese, e esperamos fazê-la para tentar compreender melhor a participação de galectina-1 nos estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*.

Figura 15 – Avaliação da participação da Gal-1 endógena na atividade tripanocida de macrófagos infectados com *T. cruzi*. Células aderentes provenientes do peritônio de camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da galectina-1 foram infectados formas tripomastigotas de *T. cruzi* e o número de parasitas liberados por dia foi contado para determinação de sua capacidade tripanocida. Foram utilizados macrófagos de 5 animais de cada grupo. **A** – número de tripomastigotas liberadas por dia de infecção por mililitro de sobrenadante de cultura e **B** – Concentração de nitritos no sobrenadante de cultura. Nota-se uma diferença significativa entre o número de tripomastigotas liberadas pelos macrófagos WT e os macrófagos KO Gal-1, no 4º e no 5º dias pós-infecção (*P<0,05 e **P<0,01, respectivamente), bem como na concentração de nitritos destes grupos (***P<0,001 e **P<0,01, respectivamente). A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) “two-way”, seguida de pós-teste de Bonferroni.

5. Conclusão

Galectina-1 exógena, e a ausência de galectina-1 endógena, favorecem o controle da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*: (i) por promover uma melhor contenção do parasita no sítio de infecção e (ii) mediar perfis imunológicos protetores do hospedeiro.

6. Referências bibliográficas

ABEL, L.C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E.A.; TEIXEIRA, H.C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, London, v. 17(1), p. 99-107, Aug. 2001.

ABRAHAMSOHN IA, COFFMAN RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 155(8), p. 3955-63, Oct 1995.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental Parasitology**, New York, v.84, p. 231-44, Nov. 1996.

ABRAHAMSOHN, I.A., DA SILVA, A.P., COFFMAN, R.L. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68(4), p.1975-9, Apr. 2000.

ACOSTA-SERRANO A, ALMEIDA IC, FREITAS-JUNIOR LH, YOSHIDA N, SCHENKMAN S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 114(2), p. 143-50 May 2001.

ADAD, S. J.; ANDRADE, D. C.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. [Pathological anatomy of chagasic megaesophagus]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.33, 443-50, Nov-Dec, 1991.

ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **Journal of Leukocyte Biology**, NewYork, v. 70(4), p. 467-477, Oct. 2001.

ALVES CM, SILVA DA, AZZOLINI AE, MARZOCCHI-MACHADO CM, CARVALHO JV, PAJUABA AC, LUCISANO-VALIM YM, CHAMMAS R, LIU FT, ROQUE-BARREIRA MC, MINEO JR. Galectin-3 plays a modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. **Immunobiology**, Amsterdam, v. 215(6), p. 475-85, Jun. 2010.

ANDRADE, S.G., ANDRADE, V., BRODSKYN, C., MAGALHÃES, J.B., NETTO, M.B. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 79(4), p. 397-407, Aug. 1985.

ANDRADE, Z. A. [The pathology of Chagas disease in man]. **Annales de la Société belge de médecine tropicale**, v.65 Suppl 1, 15-30, 1985.

ANSELM, A.; MOLEIRO, F. [Chagas' disease and chagasic myocardiopathies]. **Archivos del Instituto de Cardiología de México**, v.42, 622-8, Jul-Aug, 1972.

ANTUNEZ, M.I., CARDONI, R.L. IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 71, p. 103–109, Feb. 2000.

ANTUNEZ, M.I., CARDONI, R.L. *Trypanosoma cruzi*: the expansion of NK, T, and NKT cells in the experimental infection. **Experimental Parasitology**, New York, v. 106, p. 85–94, Mar-Apr. 2004.

BANCHEREAU, J., STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, Basingstoke, v. 392(6673), p. 245-52, Mar. 1998.

BARONDES, S.H., CASTRONOVO, S., COOPER, D.N.W., CUMMINGS, R.D., DRICKAMER, K., FEIZI, T., GITT, M.A., HIRABAYASHI, J., HUGHES, R.C., KASAI, K., LEFFLER, H., LIU, F., LOTAN, R., MERCURIO, A.M., MONSIGNI, M., PILLAI, S., POIRER, F., RAZ, A., RIGBY, P.W.J., RINI, J.M., WANG, J.L. Galectins: a family of animal β -galactoside-binding lectins. **Cell**, Cambridge, v.76: p.597-598, Jun. 1994b.

BARONDES, S.H., COOPER, D.N., GITT, M.A., LEFFLER, H. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269 (33), p. 20807-10, Aug. 1994a.

BARRETT, M.P., BURCHMORE, R.J., STICH, A., LAZZARI, J.O., FRASCH, A.C., CAZZULO, J.J., KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **Lancet**, London, v. 362(9394), p. 1469-1480, Nov. 2003.

BASTOS, K. R.; ALVAREZ, J. M.; MARINHO, C. R.; RIZZO, L. V.; LIMA, M. R. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.71, p. 271-8, Feb. 2002.

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

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

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

BLOIS, S.M., ILARREGUI, J.M., TOMETTEN, M., GARCIA, M., ORSAL, A.S., CORDO-RUSSO, R., TOSCANO, M.A., BIANCO, G.A., KOBELT, P., HANDJISKI, B., TIRADO, I., MARKERT, U.R., KLAPP, B.F., POIRIER, F., SZEKERES-BARTHO, J., RABINOVICH, G.A., ARCK, P.C. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal

tolerance. **Nature Medicine**, New York, v. 13(12), p. 1450-7, Dec. 2007. Erratum in: *Nat Med*. May. 2009, v. 15(5), p. 584.

BRENER Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 27, p.347-382, 1973.

BRENER, Z., CHIARI, E. Observations on the chronic phase of experimental Chagas' disease in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 5, p. 128-132. May-Jun. 1963.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **International archives of allergy and immunology**, Basel, v. 114, p. 103-110. Oct. 1997

CAMARGO, M.M.; ALMEIDA, I.C.; PEREIRA, M.E.; FERGUSON, M.A.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 158(12), p. 5890-5901, Jun. 1997.

CAMBY, I., LE MERCIER, M., LEFRANC, F., KISS, R. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, Oxford, v. 16(11), p. 137R-157R, Nov. 2006.

CAMPO, V. L., CARVALHO, I., ALLMAN, S., DAVIS, B. G., FIELD, R. A. Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycosyl-amino acids and glycopeptides related to *Trypanosoma cruzi* mucins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Piccadilly, v. 5(16), p. 2645-2657, Aug. 2007.

CAMPOS, M.A.; ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE E.P., PROCOPIO D.O., TRAVASSOS L.R., SMITH J.A., GOLENBOCK D.T., GAZZINELLI R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167(1), p. 416-23, Jul. 2001.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and immunity**, Bethesda, vol. 64(1), p. 128-134, Jan, 1996.

CHAUSSABEL, D., PAJAK, B., VERCROYSE, V., BISSEYÉ, C., GARZÉ, V., HABIB, M., GOLDMAN, M., MOSER, M., VRAY, B. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 83(9), p. 1373-82, Sep. 2003.

CHEN L, WATANABE T, WATANABE H, SENDO F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 31(1), p. 265-75, Jan. 2001.

CHESSLER AD, UNNIKRISHNAN M, BEI AK, DAILY JP, BURLEIGH BA. *Trypanosoma cruzi* triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182(4), p. 2288-96, Feb. 2009.

CHIAROTTI, L, SALVATORE, P, BENVENUTO, G, BRUNI, CB. Control of galectin gene expression. **Biochimie**, Paris, v. 81(4), p. 381-8, 1999.

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

CHO M., CUMMINGS R. D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270 (10), p. 5207-12, Mar. 1995.

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

COOPER, D. N., BARONDES, S. H. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, Oxford, v. 9(10), p. 979-984, Oct. 1999.

COOPER D, NORLING LV, PERRETTI M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow, **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83(6), p.1459-66, Jun. 2008.

CORREA SG, SOTOMAYOR CE, AOKI MP, MALDONADO CA, RABINOVICH GA. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, Oxford, v. 13(2), p. 119-128, Feb. 2003.

CORSINI, A. C.; BRAZ, R.; CIAMPI, D. B.; ZUCATO, M. R. Resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in relation to the timing of IgG humoral response. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v.68, p.15-25, 1982.

COSTA, V.M., TORRES, K.C., MENDONÇA, R.Z., GRESSER, I., GOLLOB, K.J., ABRAHAMSOHN, I.A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177(5), p.3193-200, Sep. 2006.

CUELLAR A, SANTANDER SP, THOMAS MDEL C, GUZMÁN F, GÓMEZ A, LÓPEZ MC, PUERTA CJ. Monocyte-derived dendritic cells from chagasic patients vs healthy donors secrete differential levels of IL-10 and IL-12 when stimulated with a protein fragment of *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70. **Immunology and Cell Biology**, London, v. 86(3), p. 255-60, Mar-Apr. 2008.

CUERVO, H., PINEDA, M.A., AOKI, M.P., GEA, S., FRESNO, M., GIRONÈS, N. Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 197(12), p. 1772-82 Jun. 2008.

CUMMINGS, R.D., LIU, F.T. Galectins, chapter 33. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. **Essentials of Glycobiology**. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., New York, 2009.

CUMMINGS, K.L., TARLETON, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 53–59, Jun. 2003.

DA MATTA GUEDES PM, GUTIERREZ FR, MAIA FL, MILANEZI CM, SILVA GK, PAVANELLI WR, SILVA JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4(2), e604, Feb. 2010.

DE MEIS, J., MORROT, A., FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A., VILLA-VERDE, D.M., SAVINO, W. Differential regional immune response in chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 3(7), p. e417, Jul. 2009.

DE TITTO, E. H.; CATTERALL, J. R.; REMINGTON, J. S. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.137, 1342-5, Aug.1986.

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

DIAS-BARUFFI, M., ZHU, H., CHO, M., KARMAKAR, S., McEVER, 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(42), p. 41282-41293, Oct. 2003.

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; MOON-JAE, C.H.O.; KARMAKAR, S.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1 induction of Adapararesis in Human leukocytes. **Glycobiology**, Oxford, abstract, v. 11(10), p. 889, Oct. 2001.

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

DOS SANTOS, P.V.; ROFFE, E.; SANTIAGO, H.C.; TORRES, R.A.; MARINO, A.P.; PAIVA, C.N.; SILVA, A.A.; GAZZINELLI, R.T.; LANES-VIEIRA, J. Prevalence of CD8⁺alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low} LFA-1^{High} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes and infection/ Institut Pasteur**, Paris, v.3, p. 971-984, Oct. 2001.

DRAPIER, J.C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J.B. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 18, p. 1587-1592, Oct. 1988.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.263, p.9557-9560, Jul. 1988.

DUNPHY, JL, BARCHAM, GJ, BISCHOF RJ, YOUNG, AR, NASH, A, MEEUSEN EN. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277(17), p. 14916-24, Apr. 2002.

DUTHIE, M.S., KAHN, S.J. During acute *Trypanosoma cruzi* infection highly susceptible mice deficient in natural killer cells are protected by a single alpha-galactosylceramide treatment. **Immunology**, Oxford, v. 119(3), p. 355-61, Nov. 2006.

DUTHIE, M.S., KAHN, M., WHITE, M., KAPUR, R.P., KAHN, S.J. Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73(1), p. 181-92, Jan. 2005.

EARL LA, BI S, BAUM LG. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285(4), p. 2232-44, Jan. 2010.

EARLAM, R. J. Gastrointestinal aspects of Chagas' disease. **The American journal of digestive diseases**, New York, v.17, p. 559-71, Jun. 1972.

ESPELI, M., MANCINI, S.J., BRETON, C., POIRIER, F., SCHIFF, C. Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions. **Blood**, Washington, v. 113(23), p. 5878-86, Jun. 2009.

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

FULCHER, J.A., CHANG, M.H., WANG, S., ALMAZAN, T., HASHIMI, S.T., ERIKSSON, A.U., WEN, X., PANG, M., BAUM, L.G., SINGH, R.R., LEE, B. Galectin-

1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and PKC signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, Jul. 2009. [Epub ahead of print].

FULCHER, J.A., HASHIMI, S.T., LEVRONEY, E.L., PANG, M., GURNEY, K.B., BAUM, L.G., LEE, B. Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177(1), p. 216-26, Jul. 2006.

GALVAO DA SILVA, A. P.; JACYSYN, J. F.; DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology**, Oxford, v.108, p. 230-7, Feb. 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. 2058-2065, Mar. 2007.

GAUTHIER, L., ROSSI, B., ROUX, F., TERMINE, E., SCHIFF, C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99(20), p. 13014-9, Oct. 2002.

GAZZINELLI, R. T.; HAYASHI, S.; WYSOCKA, M.; CARRERA, L.; KUHN, R.; MULLER, W.; ROBERGE, F.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v.41, 9S, Sep-Oct.1994.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90(13), p. 6115-6119, Jul. 1993.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves a L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 22, p. 2501-2506, Oct. 1992.

GILLIAM, M. B.; SHERMAN, M. P.; GRISCAVAGE, J. M.; IGNARRO, L. J. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus nitrate* reductase. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.212, p. 359-65, Aug.1993

GIORDANENGO, L., GEA, S., BARBIERI, G., RABINOVICH, G.A. Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this beta-galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. **Clinical Experimental**

Immunology, Oxford, v. 124, p. 266-273, Mar. 2001.

GONCALVES DA COSTA, S. C.; LAGRANGE, P. H.; HURTREL, B.; KERR, I.; ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. **Annales d'immunologie**, Paris, v. 135C(3), p. 317-332, May-Jun, 1984.

GREEN, L. C., TANNENBAUN, S. R., GOLDMAN, P. Nitric biosynthesis in germfree and conventional rat. **Science**, Washington, v. 212, p. 56-58, Apr. 1981.

GUARNER, J.; BARTLETT, J.; ZAKI, S. R.; COLLEY, D. G.; GRIJALVA, M. J.; POWELL, M. R. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.65, p.152-8, Aug. 2001.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 354(9185), p. 1191-9, Oct. 1999.

HIGUCHI, Mde L.; GUTIERREZ, P. S.; AIELLO, V. D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Archives A. Pathological anatomy and histopathology**, Berlin, vol. 423(3), p. 157-160, 1993.

HOFT, D.F., SCHNAPP, A.R., EICKHOFF, C.S., ROODMAN, S.T. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68(1), p. 197-204, Jan. 2000.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and immunity**, Bethesda. v. 66(3), p.1208-1215, Mar. 1998

HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; DAI, W. J.; KOHLER, G.; RYFFEL, B.; SCHAUB, G. A.; MOSSMANN, H.; BROMBACHER, F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 68(7), p. 4075-4083, Jul. 2000.

HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.158, 3311-6, Apr. 1997.

HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 64(7), p. 2381-2386, Jul. 1996.

JONES C, TODESCHINI AR, AGRELLOS OA, PREVIATO JO, MENDONÇA-PREVIATO L. Heterogeneity in the Biosynthesis of Mucin O-Glycans from *Trypanosoma cruzi* Tulahuen Strain with the Expression of Novel Galactofuranosyl-Containing Oligosaccharides. **Biochemistry**, Washington, v. 43(37), p. 11889-11897, Sep. 2004.

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

KIERSZENBAUM, F., HOWARD, J. G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.116, p. 1208-11, May 1976.

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

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R. M.; CLARK, S. C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.170, p. 827-45, Sep.1989.

KOPCOW, H.D., ROSETTI, F., LEUNG, Y., ALLAN, D.S., KUTOK, J.L., STROMINGER, J.L. T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105(47), p. 18472-7, Nov. 2008.

KORBELA, D.S., FINNEYB, O.C., RILEY, E.M. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p.1517–1528, Dec. 2004.

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

LEFFLER, H., CARLSSON, S., HEDLUND, M., QIAN,Y., POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, Boston, v. 19(7-9), p. 433-440, Nov. 2004.

LIEKE, T., STEEG, C., GRAEFE, S.E., FLEISCHER, B., JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 145(2), p. 357-64, Aug. 2006.

LIMA, E. S.; ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. TNF-alpha is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v.82, p.327-36, Dec. 2001.

LIPSCOMB MW, CHEN L, TAYLOR JL, GOLDBACH C, WATKINS SC, KALINSKI P, BUTTERFIELD LH, WESA AK, STORKUS WJ. Ectopic T-bet expression licenses dendritic cells for IL-12-independent priming of type 1 T cells in vitro. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 83(11), p. 7250-8, Dec. 2009.

LIU, F.T., RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Review Cancer**, New York, v. 5, p. 29-4, Feb 2005.

LIU FT, RABINOVICH GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1183, p.158-82, Jan 2010.

LIU, F.T. Regulatory roles of galectins in the immune response. **International archives of allergy and immunology**, New York, v. 136(4), p. 385-400, Aug. 2005.

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

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

LYKENS JE, TERRELL CE, ZOLLER EE, DIVANOVIC S, TROMPETTE A, KARP CL, ALIBERTI J, FLICK MJ, JORDAN MB. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 184(2), p.877-85, Jan. 2010.

MARIANO, F.S., GUTIERREZ, F.R., PAVANELLI, W.R., MILANEZI, C.M., CAVASSANI, K.A., MOREIRA, A.P., FERREIRA, B.R., CUNHA, F.Q., CARDOSO, C.R., SILVA, J.S. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10(7), p. 825-833, Jun. 2008.

MARTIN, D., TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 201, p. 304-17, Oct. 2004.

MELO, R.C. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, London, v. 13(2), p. 279-94, Feb. 2009.

MELO, R. C., BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of Parasitology**, Washington, v. 64(3), p. 475-482, Jun. 1978.

MELO RC, MACHADO CR. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 97(1), p. 15-23, Jan. 2001.

MICHAILOWSKY V, SILVA NM, ROCHA CD, VIEIRA LQ, LANNES-VIEIRA J, GAZZINELLI RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 159(5), p.1723-33, Nov. 2001.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.77, p. 6810-4, Nov. 1980.

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(2), p. 493-502, Jan. 2000.

MONCAYO, A., ORTIZ YANINE, M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of tropical medicine and parasitology**, Liverpool, v. 100(8), p. 663-677, Dec. 2006.

MONTES, C. L.; ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; MUCCI, J.; ZUNIGA, E. I.; CAMPETELLA, O.; GRUPPI, A. A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.36, p. 1474-85, Jun. 2006.

MOTRAN, C.C., MOLINDER, K.M., LIU, S.D., POIRIER, F., MICELI, M.C. Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 38(11), p. 3015-3027, Nov. 2008.

NAGINENI, C. N.; PARDHASARADHI, K.; MARTINS, M. C.; DETRICK, B.; HOOKS, J. J. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in

human retinal pigment epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.64, p. 4188-96, Apr. 1996.

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

NOMIZO, A.; POSTOL, E.; DE ALENCAR, R.; CARDILLO, F.; MENGEL, J. Natural killer T cells are required for the development of a superantigen-driven T helper type 2 immune response in mice. **Immunology**, Oxford, v.116, p. 233-244, Oct. 2005.

NOMIZO, A.; CARDILLO, F.; POSTOL, E.; DE CARVALHO, L. P.; MENGEL, J. V gamma 1 gammadelta T cells regulate type-1/type-2 immune responses and participate in the resistance to infection and development of heart inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected BALB/c mice. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 8, p. 880-888, Mar. 2006.

NORLING, L.V., SAMPAIO, A.L., COOPER, D., PERRETTI, M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 22(3), p. 682-690, Mar. 2008.

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

OSWALD I.P., GAZZINELLI R.T., SHER A., JAMES S.L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148(11), p.3578-82, Jun. 1992.

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(7), p. 3801-3811, 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(5), p. 2331-2334, Mar. 2000.

PAVANELLI WR, GUTIERREZ FR, MARIANO FS, PRADO CM, FERREIRA BR, TEIXEIRA MM, CANETTI C, ROSSI MA, CUNHA FQ, SILVA JS. 5-Lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, New York, Apr. 2010. [Epub ahead of print]

PERILLO, N.L., PACE, K.E., SEILHAMER, J.J., BAUM, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, London, v. 378(6558), p. 736-9, Aug. 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(10), p. 1851-1858, May 1997.

PERLETH, M. The discovery of Chagas' disease and the formation of the early Chagas' disease concept. **History and philosophy of the life sciences**, London, v. 19(2), p. 211-236, Feb. 1997.

PERONE, M.J., BERTERA, S., TAWADROUS, Z.S., SHUFESKY, W.J., PIGANELLI, J.D., BAUM, L.G., TRUCCO, M., MORELLI, A.E. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177(8), p. 5278-89, Oct. 2006.

PLAYFAIR, J. H.; TAVERNE, J. Antiparasitic effects of tumour necrosis factor in vivo and in vitro. **Ciba Foundation Symposium**, Amsterdam, v.131, 192-205, 1987.

PONCINI, C.V., ALBA SOTO, C.D., BATALLA, E., SOLANA, M.E., GONZÁLEZ CAPPA, S.M. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76(6), p. 2633-41, Jun. 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**. New York, v. 1, p. 92- 100, Sep. 2001.

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

RABINOVICH, G.A., ARIEL, A., HERSHKOVIZ, R., HIRABAYASHI, J., KASAI, K.I., LIDER, O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and pro-inflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. **Immunology**, Oxford, v. 97, p. 100–106, Jun. 1999.

RABINOVICH, G.A., BAUM, L.G., TINARI, N., PAGANELLI, R., NATOLI, C., LIU, F.T., IACOBELLI, S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23(6), p. 313-20, Jun. 2002.

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

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

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(10), p. 4831–4840. May. 1998.

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(2), p. 365–373, Aug. 1997.

RABINOVICH, G.A., SOTOMAYOR, C.E., RIERA, C.M., BIANCO, I., CORREA, S.G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 30(5), p. 1331-1339, Nov. 2000b.

REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H.; MORRISSEY, P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 153(7), p. 3135-40, Oct. 1994.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. [Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro**, v. 31(3), p. 301-14, May-Jun. 1998.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; ROSSI, M. A. Imunopatologia. In: J. R. Cançado and M. Chuster - **Cardiopatia chagásica**. Belo Horizonte, Fundação Carlos Chagas, p.10-22. 1985.

ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **International journal of cardiology**, Amsterdam, v. 30(3), p. 335-40, Mar. 1991.

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

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MINOPRIO, P.; EISEN, H.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, Oxford, v.11, 385-95, Jul. 1989.

SALES Jr, P.A., GOLGHER, D., OLIVEIRA, R.V., VIEIRA, V., ARANTES, R.M., LANNES-VIEIRA, J., GAZZINELLI, R.T. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10(6), p. 680-8, May. 2008.

SANTOS, J.L., ANDRADE, A.A., DIAS, A.A., BONJARDIM, C.A., REIS, L.F., TEIXEIRA, S.M., HORTA, M.F. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, Larchmont, v. 26(9), p. 682-8, Sep. 2006.

SANTOS-BUCH, C. A. American trypanosomiasis: Chagas' disease. **International review of experimental pathology**. New York, v.19, p. 63-100, 1979.

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

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

SARDINHA, L.R., ELIAS, R.M., MOSCA, T., BASTOS, K.R., MARINHO, C.R., D'IMPÉRIO LIMA, M.R., ALVAREZ, J.M. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74(4), p. 2031-42, Apr. 2006.

SATO S, BURDETT I, HUGHES RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 207(1), p. 8-18, Jul. 1993.

SCHENKMAN, S., JIANG, M.-S., HART, G. W., NUSSENZWEIG, V. A novel surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, Cambridge, v. 65, p. 1117-1125, Jun. 1991.

SCHMIDT, H. H., WILKE, P., EVERS, B., BOHME, E. Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 165(1), p. 284-291, Nov. 1989.

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

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Oxford , v.14, p.53R-62R, Nov. 2004.

SHODA, L. K.; KEGERREIS, K. A.; SUAREZ, C. E.; RODITI, I.; CORRAL, R. S.; BERTOT, G. M.; NORIMINE, J.; BROWN, W. C. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 69(4), p. 2162-71, Apr. 2001.

SILVA GK, GUTIERREZ FR, GUEDES PM, HORTA CV, CUNHA LD, MINEO TW, SANTIAGO-SILVA J, KOBAYASHI KS, FLAVELL RA, SILVA JS, ZAMBONI DS. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses

account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 184(3), p. 1148-52, Feb. 2010.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.175, p.169-74, Jan.1992.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, Washington, v.63, p. 4862-7, Dec.1995.

SMYTH, M.J., CRETNEY, E., KELLY, J.M., WESTWOOD, J.A., STREET, S.E., YAGITA, H., TAKEDA, K., VAN DOMMELEN, S.L., DEGLI-ESPOSTI, M.A., HAYAKAWA, Y. Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 42(4), p. 501-10, Feb. 2005.

STAROBINAS, N.; RUSSO, M.; MINOPRIO, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Is TNF-alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? **Research in Immunology**, Amsterdam, v.142, p.117-22, Feb. 1991.

STOWELL SR, ARTHUR CM, DIAS-BARUFFI M, RODRIGUES LC, GOURDINE JP, HEIMBURG-MOLINARO J, JU T, MOLINARO RJ, RIVERA-MARRERO C, XIA B, SMITH DF, CUMMINGS RD. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nature Medicine*, New York, v. 16(3), p. 295-301, Mar. 2010.

STOWELL, S.R., DIAS-BARUFFI, M., PENTTILA, L., RENKONEN, O., NYAME, A.K., CUMMINGS, R.D. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, Oxford, v. 14(2), p. 157-67, Jun. 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(1), p. 219-227, Jan. 2007.

STOWELL, S.R., QIAN, Y., KARMAKAR, S., KOYAMA, N.S., DIAS-BARUFFI, M., LEFFLER, H., MCEVER, R.P., CUMMINGS, R.D. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180(5), p. 3091-102, Mar 2008.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.177, p. 1797- 802, Jun.1993.

TALVANI A, COUTINHO SF, BARCELOS LDA S, TEIXEIRA MM. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104(5), p. 1141-8, Apr. 2009.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J.S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi* infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, p. 4247-53, Aug. 2002.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V.; MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, Paris, v.2, p. 851-66, Jul. 2000.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.5, p. 400-19, Oct. 1992.

TARLETON, R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 19(4), p. 430-4, Aug. 2007.

TARLETON, R. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.140, p. 2769-73, Apr. 1988.

TERNESS P, KALLIKOURDIS M, BETZ AG, RABINOVICH GA, SAITO S, CLARK DA. Tolerance signaling molecules and pregnancy:IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 58(3), p. 238-54, Sep. 2007.

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

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

TRIPP, C. S.; GATELY, M. K.; HAKIMI, J.; LING, P.; UNANUE, E. R. Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.152, p. 1883-7, Feb. 1994.

TRISCHMANN, T. M. *Trypanosoma cruzi*: early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. **Experimental parasitology**, Orlando, v. 62(2), p.194-201, Oct. 1986.

TROCOLI-TORRECILHAS, A.C., TONELLI, R.R., PAVANELLI, W.R., DA SILVA, J.S., SCHUMACHER, R.I., DE SOUZA, W., E SILVA, N.C., DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I., COLLI, W., MANSO ALVES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes and Infection**, Paris, v.11(1), p. 29-39, Jan. 2009.

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; ANGELO-BARRIOS, A.; LUCAS, R.; HEREMANS, H.; DE BAETSELIER, P.; CARLIER, Y. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. **Parasite Immunology**, Oxford, v.17, p.561-8, Nov.1995.

UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O.; LEVITUS, G.; PONCE, C.; PONCE, E.; HENRIQUEZ, D.; REVOLLO, S.; ESPINOZA, B.; SOUSA, O.; KHAN, B.; DA SILVEIRA, J. F. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.42, p. 449-52, Jan. 2004.

VAN DER LEIJ, J., VAN DEN BERG, A., BLOKZIJL, T., HARMS, G., VAN GOOR, H., ZWIERS, P., VAN WEEGHEL, R., POPPEMA, S., VISSER, L. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. **The Journal of Pathology**, London, v. 204(5), p. 511-518, Dec. 2004.

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(4), p. 506-13, Jan. 2007.

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

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

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and immunity**, Bethesda, v.62, p. 5177-5182, Nov. 1994.

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

VITELLI-AVELAR, D.M., SATHLER-AVELAR, R., MASSARA, R.L., BORGES, J.D., LAGE, P.S., LANA, M., TEIXEIRA-CARVALHO, A., DIAS, J.C., ELÓI-SANTOS, S.M., MARTINS-FILHO, O.A. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 145(1), p. 81-92, Jul. 2006.

VRAY B, CAMBY I, VERCROYSSSE V, MIJATOVIC T, BOVIN NV, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, KALTNER H, SALMON I, GABIUS HJ, KISS R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, New York, v. 14(7), p. 647-57, Jul. 2004.

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**, Hagerstown, v. 80(8), p. 1233-1241, Aug. 2000.

ZHOU, Q., CUMMINGS, R.D. L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. Jun 24. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 300(1), p. 6-17, Jan. 1993.

ZÚÑIGA, E., GRUPPI, A., HIRABAYASHI, J., KASAI, K.I., RABINOVICH, G.A. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 6804-6812, Sep. 2001a.

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