UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Envolvimento de galectina-1 na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*

Thalita Bachelli Riul

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Envolvimento de galectina-1 na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Thalita Bachelli Riul

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto
2014

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
Envolvimento de galectina-1 na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*, Ribeirão Preto, 2014.
116p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, 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: Envolvimento de galectina-1 na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição_____Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição_____Assinatura_____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

Meus pais, Mara Teresa e Carlos Alberto,

Minha Irmã Nathalia,

Meus avós, tios, tias, primos e primas,

E ao meu namorado, Douglas,

Poderia 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.

Agradecimentos

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.

Aos amigos do laboratório de Glicoimunobiologia da FCFRP
Rubens Eduardo da Silva, Lilian Cataldi Rodrigues, Camillo Del Cistia Andrade, Daniel Giuliano Cerri, Marise Lopes Fermino, Flávia Porto Pelá, João Francisco Peinado Pereira, Elder Francisco Latorraca, Robinson Antônio Martins Oliveira, Thaís Leite, Thaís Canassa, Thaís Plépis e Tatiane, pela ótima convivência, apoio e amizade, fatores fundamentais para mim todos esses anos. Foi ótimo trabalhar com vocês.

Ao Laboratório de Citologia Clínica
Profa. Dra. Maria Regina Torqueti, Francine Junta Bianchini, Bianca Stocco, Douglas Sousa Amaral e Caroline Bianchi, pelo carinho, 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 Morais, 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.

Ao Laboratório de Imunorregulação da FCFRP
Helioswilton Sales de Campos e Viviani Nardini, pela amizade e auxílio na realização de experimentos.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP
Vanessa Leiria Campo, pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste e de outros trabalhos.

Ao Serviço de Biotério da FCFRP
Reinaldo Fernando Batista, Ronaldo de Araújo, Fábio Junio Marsola e Antônio Flávio Quintanilha Marongio, pela amizade e auxílio na manutenção dos animais utilizados nesse trabalho.

À Seção de Pós graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
E aos funcionários do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia

Aos funcionários da FCFRP
Wania Maria Tavares da Silva, Tania Mara Cesare Ogasawara, Luciana Ambrósio, Jennifer Michiko Chauca Yokoya, Luiz Fernando Princi Chaim, João José Franco, pela amizade, auxílio e colaboração neste trabalho.

Aos amigos com os quais trabalhei durante este e outros projetos
Daniel Roberto Callejon, Eleni José Linjardi, Karina Alves de Toledo, Amanda Cristina Trabuco, Amanda Natalina Faria, Maria Júlia Gabriel, Renata Tomé Alves, Marlise Bonetti Agostinho Montes, pela dedicação, conselhos, ajuda, amizade, os quais me fizeram muito feliz, colaboraram com meu crescimento profissional e jamais esquecerei. Muito obrigada pelo carinho.

À 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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
Pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

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

Epígrafe

"Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito"

Aristóteles

RESUMO

Riul, T. B. **Envolvimento de galectina-1 na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi***. 2014. 116f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

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 e infecciosas. Entretanto, são escassos os relatos sobre o envolvimento da Gal-1 na infecção causada por *Tripanosoma cruzi*. Neste trabalho foi avaliada a participação da Gal-1 endógena e a administração de Gal-1 exógena na evolução da infecção aguda induzida experimentalmente por *T. cruzi*. Foram realizados experimentos *in vivo* e/ou *in vitro* com o uso de Gal-1 recombinante humana, camundongos C57BL/6 deficientes do gene da Gal-1 (Gal-1 KO, knock-out) ou do gene *Toll Like Receptor 4* (TLR-4 KO*, knock-out*) e selvagens (WT*, wild type*), além de seus macrófagos. A forma de *T. cruzi* utilizada foi a tripomastigota da cepa Y. Os parâmetros analisados na caracterização do processo de infecção foram: i) parasitemia e sobrevivência de animais; ii) histopatologia do tecido cardíaco; iii) imunofenotipagem de leucócitos; iv) dosagem de citocinas; v) determinação de taxas de invasão e liberação de parasitas a partir de células infectadas; vi) produção de óxido nítrico por macrófagos. A Gal-1 e/ou anticorpos anti-glicopeptídeos miméticos de mucina de *T. cruzi* ligam-se à glicanas da superfície deste parasita e impedem sua invasão em fibroblastos e sua captura por macrófagos. O tratamento de macrófagos infectados com Gal-1 reduz a liberação de parasitas e aumenta a produção de óxido nítrico (NO) por um mecanismo, aparentemente, independente da sinalização via TLR-4. Os camundongos KO Gal-1 e os WT tratados com Gal-1 exógena apresentaram as menores taxas de parasitemia, sendo que os primeiros são mais resistentes à infecção aguda por *T. cruzi*. A ausência da Gal-1 endógena nos animais infectados provocou vários efeitos como a redução no infiltrado inflamatório e carga parasitária no tecido cardíaco, níveis séricos elevados de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A), menor porcentagem de linfócitos T CD4+ e maior de T CD8+ no coração dos animais, aumento do influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal e no coração. 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. **Involvement of galectin-1 on acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** 2014. 116p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Galectin-1 (Gal-1) is a protein that recognizes β-galactosides and participates in many biological processes, including the modulation of the immune response. Several reports in the literature show the potential therapeutic use of Gal-1 to autoimmune, inflammatory and infectious diseases. However, there are few reports on the involvement of Gal-1 on infection caused by *Trypanosoma cruzi*. Here, we evaluated the involvement of endogenous Gal-1 and Gal-1 administration of exogenous in the development of acute experimental infection by *T. cruzi*. Recombinant human Gal-1, C57BL/6 mice deficient for Gal-1 gene (Gal-1 KO, knock-out) or for Toll like receptor 4 gene (TLR-4 KO, knock-out) or C57BL/6 wild type mice (WT), and macrophages from these animals were used in experiments *in vivo* and / or *in vitro*. The form of *T. cruzi* used in this work was trypomastigotes from Y strain. The analyzed parameters characterizing the process of infection were: i) parasitemia and survival of animals; ii) histopathology of cardiac tissue; iii) leucocyte immunophenotyping; iv) cytokine assay; v) determination of invasion and release rates of parasites from infected cells; vi) nitric oxide production by macrophages. The Gal-1 and / or antibodies anti- glycopeptides that mimics *T. cruzi* mucin bind to glycans on the surface of this parasite and prevent invasion of the parasite in fibroblasts and its capture by macrophages. Treatment of infected macrophages with Gal-1 promotes a lower release of parasites and increased production of nitric oxide (NO) by these phagocytes, and this production of NO is independent of TLR-4 signaling pathway. The Gal-1 KO mice and WT mice treated with exogenous Gal-1 had the lowest rates of parasitemia and the first group is more resistant to acute infection with *T. cruzi*. The absence of endogenous Gal-1 in infected animals caused various effects such as a reduction in the inflammatory infiltrate and the parasite load in the cardiac tissue, elevated serum levels of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-17A), a lower percentage of T CD4+ and increased T CD8+ the hearts of animals, increased influx of neutrophils into the peritoneal cavity and heart tissue. Based on this set of results we suggest that the absence of endogenous Gal-1 or treatment of animals with exogenous Gal-1 promoted immunological profiles (innate and adaptive response) favoring the resolution of acute experimental *T. cruzi* infection.

.

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

RESUMEN

Riul, T. B. **La participación de la galectina-1 en la infección experimental aguda con *Trypanosoma cruzi***. 2014. 116f. Tesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

La galectina-1 (Gal-1) es una proteína que reconoce β-galactósidos y participa en varios procesos biológicos, incluyendo la modulación de la respuesta inmunológica. Varios trabajos reportan el potencial uso terapéutico de la Gal-1 en las enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas. Sin embargo, existen pocos reportes describiendo el papel de la Gal-1 durante la infección causada por el *Trypanosoma cruzi*. En este trabajo fueron evaluados la participación de la Gal-1 endógena y la administración de la Gal-1 exógena en la evolución de la infección aguda experimental inducida por el *T. cruzi*. Fueron realizados experimentos *in vivo* y/o *in vitro* utilizando Gal-1 humana recombinante, ratones C57BL/6 deficientes en el gen codificante de la *Gal-1* (*Gal-1* KO, *knock-out*) o el gen *Toll-like receptor 4* (TLR-4 KO, *knockout*) y salvaje (WT, *wild type*), así como macrófagos de estos ratones. Las infecciones fueron realizadas con la forma tripomastigotas metacíclicas de la cepa Y de *T. cruzi*. Los parámetros utilizados para la caracterización del proceso de infeccioso fueron: i) parasitemia y supervivencia de animales infectados; ii) histopatología del tejido cardíaco; iii) immunofenotipage de leucocitos; iv) ensayo de citocinas; v) determinación de las tasas de liberación e invasión de parásitos a partir de células infectadas; y vi) producción de óxido nítrico por macrófagos. Se encontró que tanto la Gal-1 recombinante así como los anticuerpos anti-glicopéptidos miméticos de mucinas de *T. cruzi* se unen a azúcares de la superficie del parásito y evitan tanto la invasión de fibroblastos como su captura por macrófagos. El tratamiento con Gal-1 de macrófagos infectados reduce la liberación de parásitos y aumenta la producción de óxido nítrico (NO), los cuales, al parecer, son independientes de la vía TLR-4 de señalización. Los ratones *Gal-1* KO y WT tratados con Gal-1 exógena mostraron niveles menores de parasitemia, siendo la primera más resistente a la infección aguda con *T. cruzi*. La ausencia de Gal-1 endógena en animales infectados causó varios efectos tales como una reducción en el infiltrado inflamatorio y la carga de parásitos en el tejido cardíaco, un aumento en los niveles séricos de varias citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y IL- 17A), un menor porcentaje de linfocitos T $CD4^+$ y así como un incremento de T $CD8^+$ en los corazones de los animales infectados, y un aumento en el flujo de neutrófilos en la cavidad peritoneal y el corazón. Basados en este conjunto de resultados, se propone que la ausencia de Gal-1 endógena o el tratamiento de los animales con Gal-1 exógena promueve perfiles inmunológicos (respuesta innata y adaptativa) que contribuyen a restaurar la infección experimental aguda por parte del *T. cruzi*.

Palabras clave: La galectina-1, la infección por *Trypanosoma cruzi*, lectina, inmunoregulación..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil cromatográfico referente à purificação de Gal-1 em resina de agarose-lactose.....43

Figura 2: Perfis cromatográficos referentes à remoção de preservantes (Lactose, 2-ME e iodoacetamida) de preparações de Gal-1 purificada.....44

Figura 3: Perfil eletroforético e atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1 purificada, alquilada, estéril e livre de LPS e preservantes.....45

Figura 4: Galectina-1 se liga de modo carboidrato-dependente à superfície de *Trypanosoma cruzi*.....47

Figura 5: Galectina-1 não induz necrose nas células de *Trypanosoma cruzi*, na presença ou ausência de carboidratos.....48

Figura 6: Tratamento com galectina-1 ou com soro anti-glicopeptídeos sintéticos de mucina de *T. cruzi* diminui a invasão de formas tripomastigotas deste parasita em fibroblastos.....50

Figura 7: Tratamento com galectina-1 diminui a captura de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por macrófagos.....52

Figura 8: Tratamento com galectina-1 diminui a liberação de formas tripomastigotas por macrófagos infectados com *T. cruzi* e aumenta a produção de óxido nítrico nessas células.....53

Figura 9: Tratamento com galectina-1 aumenta a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com IFN-γ de maneira independente de TLR4.....55

Figura 10: Tratamento com galectina-1 diminui a parasitemia de camundongos WT infectados com *T. cruzi* de maneira independente de TLR4.....57

Figura 11: Parasitemia e taxa de mortalidade dos camundongos C57BL6 WT e KO Gal-1 infectados experimentalmente com a cepa Y de *T. cruzi*.....59

Figura 12: Perfil de células infiltradas no peritônio de camundongos WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*.....61

Figura 13: Avaliação de células imunológicas circulantes no sangue de animais WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*.....62

Figura 14: Perfil histopatológico do tecido cardíaco de camundongos WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*.....64

Figura 15 – Dosagem de mieloperoxidase (MPO) e N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) no extrato cardíaco de camundongos infectados com *T. cruzi*.....65

Figura 16 – Perfil de leucócitos infiltrados no tecido cardíaco de animais infectados por *T. cruzi* obtido por citometria de fluxo.....67

Figura 17 – Perfil de células T regulatórias infiltradas no tecido cardíaco de animais infectados por *T. cruzi* obtido por citometria de fluxo.....68

Figura 18 – Concentração de diferentes citocinas no soro de animais WT e KO Gal-1 infectados por *T. cruzi*.....69

Figura 19 – Quantificação de citocinas no extrato cardíaco de animais WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*.....71

Figura 20 – Quantificação por real-time PCR de *T. cruzi* em DNA de tecido cardíaco extraído de animais infectados.....72

Figura 21 – Avaliação da participação da Gal-1 endógena na atividade tripanocida de macrófagos infectados com *T. cruzi*.....74

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 limphoma-2* (proteína anti-apoptótica)

CD - *Cluster of Differentiation*

CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

Con-A – concanavalina-A

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

DNA – *desoxibonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

DO – Densidade óptica

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

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

F4/80 - Marcador de superfície celular para macrófagos

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

FITC - *Fluorescein isotiocianate* (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-piranozídeo

J774 – linhagem celular derivada de macrófagos murinos

KO - *knock-out* (animais destituídos de um determinado gene)

LLC-MK_2 – 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-kB - 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)

NOx - *Nitric Oxide* x (óxido nítrico x) = NO_2 e NO_3

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 Clorofil 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
Resumen.....iii
Lista de figuras.....iv
Lista de abreviaturas.....vi

1. INTRODUÇÃO.....01
1.1 O *Trypanosoma cruzi,* Doença de Chagas e sua resposta imunológica.....01
1.2 Lectinas, galectina-1 e o controle da resposta imunológica 11

2. OBJETIVOS.....21

3. METODOLOGIAS.....22
3.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica.....22
3.2 Análise eletroforética de amostras obtidas do procedimento de produção e purificação da galectina-1 recombinante humana.....23
3.3 Obtenção de galectina-1 derivatizada com isotiocianato de fluoresceína (FITC).....24
3.4 Análise da atividade lectínica de galectina-1 recombinante humana por ensaio de hemaglutinação.....24
3.5 Animais de experimentação.....25
3.6 Cultura e obtenção de tripomastigostas de *T.cruzi in vitro*.....25
3.7 Obtenção e manutenção de *T.cruzi in vivo*.....26
3.8 Ligação de Gal-1 marcada com FITC na superfície celular de *T. cruzi*.....26
3.9 Avaliação da viabilidade de diferentes formas de *T. cruzi*, após tratamento com galectina-1, por citometria de fluxo.....26
3.10 Glicopeptídeos sintéticos de mucinas de *T. cruzi* e imunização de camundongos para obtenção de anticorpos anti-glicopeptídeos sintéticos.....27
3.11 Ensaio de inibição da invasão de *T. cruzi* a fibroblastos por galectina-1 e anticorpos anti-glicopeptídeos sintéticos, e análise por *High Content Screening*.....28
3.12 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos elicitados por tioglicolato.....29
3.13 Estudo do impacto de Gal-1 sobre a atividade fagocítica de *T. cruzi* por macrófagos peritoneais.....29
3.14 Efeito do tratamento com galectina-1 na capacidade tripanocida de macrófagos peritoneais.....30
3.15 Dosagem de nitritos (NO_2^-) em sobrenadantes de cultura de células.....31

3.16 Avaliação da presença de LPS em amostras de galectina-1 por meio do ensaio de produção de óxido nítrico por macrófagos.....31
3.17 Infecção de camundongos C57BL/6 com *T. cruzi* e tratamento com Gal-1.....32
3.18 Avaliação da parasitemia.....33
3.19 Infecção de camundongos C57BL/6 destituídos (KO Gal-1) ou não (WT) com *T. cruzi*.....33
3.20 Perfil diferencial de leucócitos circulantes no sangue, e perfil da população celular no peritônio de animais infectados por *T. cruzi*.....34
3.21 Histopatologia e análise do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco.....34
3.22 Dosagem da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) em tecido cardíaco.....35
3.23 Imunofenotipagem de leucócitos infiltrados no tecido cardíaco por citometria de fluxo.....36
3.24 Preparação de extrato tecidual e dosagens de citocinas em soro e tecido cardíaco de camundongos.....38
3.25 Determinação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real.....39
3.26 Avaliação da liberação de formas tripomastigotas por células peritoneais aderentes infectadas por *T. cruzi*.....40
3.27 Análise de resultados.....40

4. RESULTADOS 41
4.1 Obtenção e purificação de galectina-1 humana dimérica.....41
4.2 A interação de galectina-1 com a superfície de *T. cruzi* é dependente da propriedade lectínica desta proteína.....46
4.3 Investigação da taxa de morte de células de *T. cruzi* tratadas com galectina-1.....47
4.4 Avaliação do efeito de galectina-1 e de anticorpos anti-glicopeptídeos sintéticos de mucina de *T. cruzi* na invasão de fibroblastos por este parasita.....48
4.5 Avaliação do efeito da galectina-1 na captura de *T. cruzi* por macrófagos peritoneais...51
4.6 Efeito do tratamento com galectina-1 na capacidade tripanocida de macrófagos peritoneais.....52
4.7 Avaliação da capacidade de galectina-1 induzir a produção de óxido nítrico em macrófagos deficientes ou não de TLR4.....54
4.8 Tratamento de camundongos infectados por *T. cruzi* com galectina-1 e determinação da parasitemia na fase aguda.....56
4.9 A presença de Gal-1 endógena afeta o número de parasitas circulantes e a taxa de mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi*.....58

4.10 Modulação do perfil de células recrutadas para o peritônio e na circulação sanguínea de camundongos infectados com *T. cruzi* causada pela ausência de Gal-1 endógena.....60
4.11 Análise do tecido cardíaco de animais infectados (WT e KO Gal-1) quanto a presença de infiltrado inflamatório, integridade das fibras musculares e detecção de parasitas.....63
4.12 Dosagem da atividade das enzimas MPO e NAG em tecido cardíaco de camundongos deficientes ou não para o gene da Gal-1 e infectados com *T. cruzi*.....65
4.13 Imunofenotipagem de linfócitos infiltrados no tecido cardíaco de animais WT ou KO Gal-1 infectados, por citometria de fluxo.....66
4.14 Dosagens de citocinas no soro e em amostras do extrato do tecido cardíaco de animais infectados.....68
4.15 Determinação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real.....72
4.16 Avaliação do impacto da Gal-1 endógena sobre a liberação de formas tripomastigotas e a produção de óxido nítrico por células peritoneais aderentes infectadas com *T. cruzi*.....73

5. DISCUSSÃO.....75

6. CONCLUSÃO.....93

7. REFERÊNCIAS 94

ANEXO.....117

1. Introdução

1.1 *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas e a sua resposta imunológica

Os parasitas dos gêneros Trypanosoma são protozoários da ordem Kinetoplatida (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 8-10 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, cerca de seis milhões de pessoas vivem com esta doença das quais seis mil morrem por ano (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006, BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014, MARTINS-MELO *et al.*, 2014). A elevada prevalência desta doença parasitária em regiões pobres do mundo, incluindo as localizadas em países desenvolvidos, e a escassez de investimentos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, indicam que o mal de Chagas é uma doença negligenciada (HOTEZ, 2008, BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014). Atualmente, em função de vários fatores, essa doença negligenciada tem se apresentado como um problema de saúde pública global. Dentre estes fatores inclui-se formas de transmissão associadas ao transplante de órgãos sólidos, transfusão sanguínea, ressurgimento da fase aguda em pacientes imunossuprimidos, infecção congênita e migração elevada de pessoas de áreas endêmicas para regiões não-endêmicas (LATTES; LASALA, 2014, MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

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 se correlacionam 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).

Trypanosoma cruzi é um protozoário intracelular obrigatório e o agente etiológico da Doença de Chagas, uma infecção debilitante e duradoura que ainda afeta milhões de pessoas ao redor do mundo (HOTEZ, 2008, BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014, MARTINS-MELO *et al.*, 2014). Diferente de outros patógenos, a persistência do *T. cruzi* no organismo parece estar ligada a sua capacidade de se replicar no interior de células nucleadas do hospedeiro e consequentemente evadir o reconhecimento e os mecanismos efetores do sistema imunológico (FERNANDES; ANDREWS, 2012). A via natural de infecção no hospedeiro vertebrado envolve a invasão do parasita através da mucosa ou feridas produzidas na pele pela picada do inseto vetor. Uma vez que as formas tripomastigotas metacíclicas entram no hospedeiro, estas podem invadir diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, músculos liso e estriado, e fibroblastos (ANDRADE; ANDREWS, 2005). As etapas iniciais da interação entre o parasita e as células do hospedeiro vertebrado são cruciais para a

disseminação do parasita e o estabelecimento da infecção. A capacidade da resposta imunológica inata do hospedeiro para controlar a proliferação do parasita, limitando sua disseminação para longe do sítio de infecção, depende da capacidade invasora do *T. cruzi*, lidando e evadindo-se dos mecanismos iniciais de defesa imunológica (TRISCHMANN, 1986, ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996, OLIVEIRA *et al.*, 2004). Esta doença pode ser fatal e apresenta alguns sintomas característicos como a miocardite de fase aguda, a qual está associada a elevados índices de parasitemia e parasitismo tecidual (TANOWITZ *et al.*, 1992, TANOWITZ *et al.*, 2009). A fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* é acompanhada por uma elevada parasitemia, parasitismo de tecidos e altas taxas de mortalidade (MARIANO *et al.*, 2008). Entretanto, em algumas situações experimentais pode não ocorre uma correlação positiva entre elevados valores de parasitemia e aumento das taxas de mortalidade de animais infectados (GUTIERREZ *et al.*, 2011, MUKHERJEE *et al.*, 2011, TOSELLO BOARI *et al.*, 2012). Ainda, na fase crônica da doença alguns indivíduos podem apresentar uma cardiomiopatia associada à insuficiência cardíaca congestiva, anormalidades de condução e eventos trombo-embólicos (HIGUCHI MDE *et al.*, 2003, ROSSI; RAMOS; BESTETTI, 2003, PRADO *et al.*, 2009, TANOWITZ *et al.*, 2009).

O sistema imune inato também é capaz de discriminar moléculas do próprio organismo de moléculas provenientes de patógenos via receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors*, ou PRR (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Estes receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*, ou PAMPs), as quais incluem diversas moléculas conservadas entre microrganismos, incluindo *T. cruzi*, e desencadeiam a ativação de respostas inatas do hospedeiro. Nessa linha, diversos componentes da superfície de *T. cruzi* já foram descritos como importantes desencadeadores de respostas imunológicas inatas, incluindo glicopeptídeos com galactose terminal (SCHENKMAN *et al.*, 1991, CAMARGO *et al.*, 1997, CAMPOS *et al.*, 2001, COELHO *et al.*, 2002, BUSCAGLIA *et al.*, 2006, KAYAMA; TAKEDA, 2010, CAMPO *et al.*, 2014). Além disso, diversos relatos na literatura mostram que a imunidade inata pode controlar a ativação de respostas adaptativas (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Diferente da resposta imunológica adaptativa, a imunidade

inata não é projetada para responder a um antígeno de um microrganismo invasor definido. Em vez disso, o sistema imune inato está programado para reconhecer uma série de padrões moleculares presentes numa determinada lesão: (i) os padrões que são derivados de microrganismos [*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)], e (ii) os padrões de moléculas intracelulares do próprio hospedeiro provenientes do tecido danificado pelo patógeno [*damage-associated molecular patterns* (DAMPs)] (RUBARTELLI; LOTZE, 2007). Atuando como imunomoduladores do sistema imune inato, tem sido proposto que os DAMPs seriam capazes de recrutar e ativar células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, podendo assim regular o desenvolvimento da resposta adaptativa; poderiam também restaurar a homeostase promovendo a reconstrução do tecido danificado, ou diretamente, ou por ação da resposta imunológica inicial (RUBARTELLI; LOTZE, 2007).

Os macrófagos são um dos mais estudados tipos celulares, os quais funcionam como sentinelas e reguladores do sistema imunológico, executando numerosas funções como apresentação de antígenos, produção de citocinas, fagocitose, migração e produção de espécies reativas de oxigênio (GARCIA-RAMALLO *et al.*, 2002, GORDON; TAYLOR, 2005). Durante infecções por protozoários intracelulares, os macrófagos são importantes células efetoras para o controle da replicação destes parasitas por mecanismos oxidativos e não-oxidativos (PIACENZA *et al.*, 2009). Por outro lado, macrófagos também são células do hospedeiro de vida longa, o que facilita a manutenção e sobrevivência dos patógenos no organismo (ZUNIGA *et al.*, 2001a). Neutrófilos, outra importante célula da resposta imunológica inata, estão entre as primeiras células a serem recrutadas para um sítio de infecção, chegando inclusive antes dos macrófagos inflamatórios. São importantes na defesa do hospedeiro através de mecanismos dependentes de moléculas oxidativas e proteases (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004, LUNA-GOMES *et al.*, 2014). O influxo inicial de neutrófilos num tecido infectado pode modificar as respostas subsequentes de células T auxiliares, o que faz dessas células um importante elo entre resposta inata e adaptativa durante as infecções parasitárias. Os neutrófilos são capazes de interagir com diferentes tipos celulares, como monócitos, células dendríticas, linfócitos B e T, através do contato direto célula-célula, ou via molécular

secretadas, direcionando respostas inflamatórias envolvendo a defesa do hospedeiro e o reparo tecidual (NATHAN, 2006).

Os PRRs mais bem caracterizados são os receptores do tipo *Toll* (Toll-like receptors, ou TLRs), os quais se localizam na membrana plasmática ou endoplasmática, e reconhecem diversos padrões moleculares de componentes microbianos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Após o reconhecimento do ligante, a ativação de vias de sinalização mediadas por TLRs são iniciadas por diferentes moléculas adaptadoras. Estas incluem MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), TIRAP [*Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein(TIRAP)/MyD88-adaptor-like protein(Mal)*], TRIF (*TIR domain-containing adaptor-including interferon*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), todas estas mediando cascatas de sinalização “dowstream” levando à ativação de fatores de transcrição, tais como NF-κB (*nuclear factor- B*) e IRF (*interferon regulatory factor*), os quais por sua vez induzem a expressão de genes de citocinas inflamatórias e quimiocinas que participam das respostas anti-microbianas (AKIRA; TAKEDA, 2004). Ao longo dos últimos anos, diversas evidências da imunologia e parasitologia indicam que diferentes moléculas provenientes de *T. cruzi* podem atuar como agonistas de TLRs. Tais componentes podem induzir resposta inflamatória, a qual está associada com a resistência do hospedeiro à infecção do parasita através da ativação da resposta imune inata e subsequente diferenciação de células T CD4+ em células efetoras do tipo Th1 (KAYAMA; TAKEDA, 2010). Nessa linha, dados da literatura mostram que TLR2 e TLR9 podem participar da imunidade contra a infecção por T. cruzi estão envolvidos de forma distinta durante a infecção experimental por *T. cruzi*, uma vez que TLR9 é crucial para a montagem de uma resposta Th1 protetora e o TLR2 apresenta um caráter imunoregulador (GRAVINA *et al.*, 2013). Entretanto, apesar dos receptores TLR2, TLR4, TLR9 e do MyD88 serem importantes na montagem de resposta imune inata contra *T.cruzi*, estas moléculas não são essenciais para a geração de uma resposta mediada por células T CD8 contra este parasita (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Já foi demonstrado que citocinas Th1 e Th2 são capazes de induzir a ativação clássica e alternativa de macrófagos, respectivamente (MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998). Macrófagos ativados de maneira clássica (M1) expressam óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enquanto a arginase-1 é

expressa aqueles ativados de forma alternativa (M2), e ambas enzimas metabolizam L-arginina (MANTOVANI *et al.*, 2002). A enzima iNOS catalisa a oxidação de L-arginina a L-citrulina e óxido nítrico (NO). Macrófagos do tipo M1 apresentam a capacidade de produzir grandes quantidades de IL-12, IL-1β, IL-6, TNF-α e baixos níveis de IL-10 (MOSSER, 2003). Estes macrófagos são capazes de eliminar patógenos intracelulares através da produção de NO. O indutor mais comum da iNOS é o IFN-γ combinado com LPS, mas IL-12, IL-1β e TNF-α também são seus indutores. Além disso, macrófagos M2 liberam IL-10 e TGF-β, e pequenas quantidades de IL-12, os quais estão envolvidos na resposta do tipo Th2, imunorregulação e remodelamento tecidual (MANTOVANI *et al.*, 2002). De forma interessante, durante a infecção por *T. cruzi*, neutrófilos, células do baço, monócitos circulantes e macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e destroem formas intracelulares deste parasita (MELO *et al.*, 2003). Apesar de haver poucos trabalhos demonstrando uma relação entre ativação de TLRs e "*burst*" oxidativo em fagócitos durante a infecção por *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al.*, 2010, ROCHA RODRIGUES *et al.*, 2012), um papel importante de MyD88 na morte de microrganismos via ativação de NADPH oxidase já foi descrito (LAROUX *et al.*, 2005). Mais ainda, ROS mitocondriais podem também contribuir para a morte de bactérias por macrófagos através do recrutamento de TLR1, TLR2 e TLR3 (WEST *et al.*, 2011).

Após o reconhecimento de componentes de *T. cruzi* via TLRs, a via dependente de MyD88 desencadeia a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como IL-12p40 e TNF-α, conforme descrito acima (CAMPOS *et al.*, 2001, CAMPOS *et al.*, 2004). Somando-se à esta via dependente de MyD88, outra molécula adaptadora, TRIF, participa da via de ativação de TLR4 e TLR3 de maneira independente de MyD88, levando à indução de interferons do tipo I (IFNs), IFN-α e IFN-β. Infecções virais, por exemplo, induzem uma expressão robusta de IFNs do tipo I. Além disso, diversos patógenos intracelulares como bactérias (por exemplo, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis*) e protozoários (por exemplo, *Leishmania major*) se mostraram capazes de induzir a expressão de IFNs do tipo I, assim como *T. cruzi* (UNE; ANDERSSON; ORN, 2003, COSTA *et al*., 2006, KOGA *et al*., 2006, CHESSLER *et al*., 2009).

Alguns mecanismos para a produção de IFNs do tipo um por células dendríticas e macrófagos mediados pela infecção por *T. cruzi* tem sido propostos (KOGA *et al.*, 2006). Camundongos destituídos dos genes para MyD88 e TRIF ($MyD88^{-/-}TRIF^{-/-}$) são altamente susceptíveis à infecção pela cepa Tulahuen de *T. cruzi*, mesmo quando comparados a animais $MyD88^{-/-}$. Macrófagos e células dendríticas $MyD88^{-/-}TRIF^{-/-}$ apresentaram um aumento acentuado do crescimento de *T. cruzi* intracelular, quando comparado com células $MyD88^{-/-}$. Em macrófagos e células dendríticas $MyD88^{-/-}$ infectados por *T. cruzi*, a expressão de IFN-β estava induzida normalmente, apesar da diminuição acentuada da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α e IL-6. Já as células $MyD88^{-/-}TRIF^{-/-}$ infectadas com *T. cruzi*, em contraste, apresentaram expressão acentuadamente diminuída de IFN-β e citocinas pro-inflamatórias (KOGA *et al.*, 2006).

Apesar de macrófagos provenientes de camundongos $IFNAR1^{-/-}$ apresentarem uma eliminação de *T. cruzi* eficiente, macrófagos provenientes de animais $MyD88^{-/-}IFNAR1^{-/-}$ apresentaram replicação de *T. cruzi* aumentada, em relação às células de animais $MyD88^{-/-}$. Apesar de camundongos $IFNAR1^{-/-}$ não demonstrarem susceptibilidade à infecção por *T. cruzi*, mesmo com uma resposta defeituosa de células NK citotóxicas (UNE; ANDERSSON; ORN, 2003), animais $MyD88^{-/-}IFNAR1^{-/-}$ se mostraram mais susceptíveis à infecção. Esses achados indicam que o IFN-β é induzido por uma via independente de MyD88 (e dependente de TRIF) e essa indução é responsável pela resistência à infecção por *T. cruzi*, a qual se torna evidente na ausência de resposta imunológica dependente de MyD88. Outro mecanismo para a produção de IFNs do tipo I mediada pela infecção por *T. cruzi* já foi proposto. Em um trabalho utilizando a cepa Y do parasita em infecção de fibrolastos e macrófagos derivados de medula óssea, a expressão de IFN-β se mostrou evidente, e também foi detectada em células provenientes de animais $MyD88^{-/-}TRIF^{-/-}$, indicando a presença de um mecanismo independente de TLRs para a expressão de IFNs do tipo I durante a infecção por *T. cruzi* (CHESSLER *et al.*, 2009). Já em animais deficientes em *TANK-binding kinase 1* (TBK1) ou *IFN regulatory factor 3* (IRF3), a expressão de IFN-β foi abolida. TBK1 e IRF3 atuam em eventos *downstream* a sensores de RNA citoplasmático, tais como RIG-I e MDA5. No entanto, a expressão de IFN-β induzida por *T. cruzi* não foi abolida em células destituídas de MAVS/IPS-

1/VISA/CARDif, que atua como um adaptador na ativação deTBK1/IRF3 mediada por RIG-I/MDA5. Dessa forma, as moléculas citoplasmáticas que reconhecem *T. cruzi* e ativam a via TBK1/IRF3 para a produção de IFNs do tipo I ainda precisam ser elucidadas (KAYAMA; TAKEDA, 2010).

Além da produção de IFNs do tipo I, resposta imunológica independentes da ativação de TLRs têm sido relacionadas com a capacidade de desencadear uma resposta adaptativa do tipo Th1. A defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares depende da produção de IFN-γ dependente de células Th1, que induzem a ativação de macrófagos para eliminar patógenos intracelulares. No entanto alguns mecanismos para o desenvolvimento de respostas Th1 independente do reconhecimento de moléculas por TLRs já foram descritos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006, ISHII *et al.*, 2008). A susceptibilidade de camundongos MyD88$^{-/-}$ à infecção por *T. cruzi* foi menor do que para aqueles animais IFN-γ$^{-/-}$, e um nível moderado de produção de IFN-γ foi induzido em animais MyD88$^{-/-}$ infectados com *T. cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2004). Tais achados indicam a presença de mecanismos independentes de MyD88 para a produção de IFN-γ durante a infecção por *T. cruzi*. Mesmo em camundongos MyD88$^{-/-}$TRIF$^{-/-}$, a produção de IFN-γ por células T CD4+ *T. cruzi*-antígeno-específicas foi induzida após a infecção com a cepa Tulahuen (CAMPOS *et al.*, 2004). Dessa forma, mesmo a ausência de ativação da resposta imunológica inata via TLRs, a resposta Th1 antígeno-específica para *T. cruzi* foi induzida.

A extensão do processo regulatório, portanto, exibe um papel crucial na progressão da doença, pela inibição da resposta inflamatória prejudicial, mas também podendo contribuir com a persistência do parasita nos tecidos. 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.*, 1999). 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).

A infecção por *T. cruzi* pode provocar no hospedeiro uma intensa reação inflamatória, acompanhada de elevada liberação de mediadores (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e outros), que visa a eliminação deste agente infeccioso (HUANG *et al.*, 1999, TANOWITZ *et al.*, 2009, PEREZ *et al.*, 2011). Ainda, o controle do parasitismo e a manifestação de uma reação protetora contra *T. cruzi* estão associados a uma resposta imune adaptativa preferencialmente de padrão Th1 (HOFT *et al.*, 2000) que pode envolver a liberação TNF-α e IL-12 por células T $CD4^+$ que estimulam a liberação de IFN-γ por células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e por células NK (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001, PADILLA; BUSTAMANTE; TARLETON, 2009, TANOWITZ *et al.*, 2009, OLIVEIRA *et al.*, 2010) e a consequente produção de óxido nítrico por fagócitos, um agente tripanocida (SILVA *et al.*, 1995).

Apesar da resposta inflamatória associada à fase aguda dessa infecção parasitária ser importante para eliminação do parasita e para a promoção da homeostase tecidual, é necessário que esse processo inflamatório seja controlado para evitar danos teciduais no hospedeiro. Este controle pode ocorrer via a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-β (SILVA; TWARDZIK; REED, 1991, SILVA *et al.*, 1992), ação de células que podem regular a atividade de células Th1 como as T regulatórias (Treg) e as Th17/IL-17 (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001, MARIANO *et al.*, 2008, TANOWITZ *et al.*, 2009, DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010, TOSELLO BOARI *et al.*, 2012) e pela indução de apoptose ou inibição da proliferação de células T efetoras (GUTIERREZ *et al.*, 2011). Por outro lado, na infeção por *T. cruzi*, a produção de citocinas regulatórias pode inibir a produção de óxido nítrico e facilitar a persistência deste parasita no hospedeiro (MARIANO *et al.*, 2008). Ainda, recentemente, foi descrito a montagem de uma resposta adequada que controle o parasitismo na

ausência de uma resposta inflamatória descontrolada e de dano tecidual depende da carga infectante de *T. cruzi* (BORGES *et al.*, 2013). Estes autores demonstraram que o uso de uma carga infectante elevada desse parasita, diferentemente de inoculo de baixa carga parasitária, promoveu uma resposta inflamatória intensa e descontrolada que foi ineficiente em conter o parasitismo e o dano tecidual mesmo com a ocorrência de maior número de células Treg/Th17 e de níveis elevado de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). Ainda, de modo interessante, nos animais infectados com baixa carga parasitária a resposta inflamatória é suficiente para controlar o parasitismo e inibir o dano tecidual de modo independente dos mecanismos regulatórios associados ás células Treg e a citocina anti-inflamatórias (SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003, FERNANDES; ANDREWS, 2012, BORGES *et al.*, 2013).

A persistência do *T. cruzi* no organismo parece estar ligada a sua capacidade de se replicar no interior de células nucleadas do hospedeiro e consequentemente evadir o reconhecimento e os mecanismos efetores do sistema imunológico como a regulação negativa da produção de óxido nítrico(SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003, FERNANDES; ANDREWS, 2012). Entretanto, a participação do óxido nítrico no mecanismo de defesa do hospedeiro à infecção por *T. cruzi* é controverso, uma vez que baixas doses desse mediador pode favorecer a replicação de *T. cruzi* e não apresentar atividade microbicida (SILVA *et al.*, 1992, SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003). A via natural de infecção no hospedeiro vertebrado envolve a invasão do parasita através da mucosa ou feridas produzidas na pele pela picada do inseto vetor. Uma vez que as formas tripomastigotas metacíclicas entram no hospedeiro, estas podem invadir diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, músculos liso e estriado, e fibroblastos (ANDRADE; ANDREWS, 2005).

Diversas evidências experimentais implicam o óxido nítrico como um importante mediador da morte de parasitas em camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi* (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). O óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso, é conhecido como uma das mais importantes moléculas efetoras das células do sistema imunológico inato. O NO é sintetizado por três diferentes classes de NO sintase: NOS induzida (iNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), as quais estão envolvidas em fenômenos como vasodilatação, inflamação e respostas imunológicas (PANIS *et al.*, 2011). O

óxido nítrico produzido por oxidação da L-arginina a citrulina pela óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é regulado por citocinas como interferon-gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral (TNF-α) (PANIS *et al.*, 2011).

Em macrófagos, a produção de óxido nítrico é induzida após estímulo inflamatório e subsequente expressão de iNOS. Já foi descrito que a via estimulatória em macrófagos é iniciada pela ligação de componentes da parede celular bacteriana como lipopolissacarídeos (LPS) a receptores do tipo-*toll* que disparam uma complexa cascata de quinases, levando à ativação do gene e subsequente expressão da iNOS (YAMANISHI *et al.*, 2009, FRANCHI; MUNOZ-PLANILLO; NUNEZ, 2012).

1.2 Lectinas, galectina-1 e controle da resposta imunológica

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; SHARON, 2009).

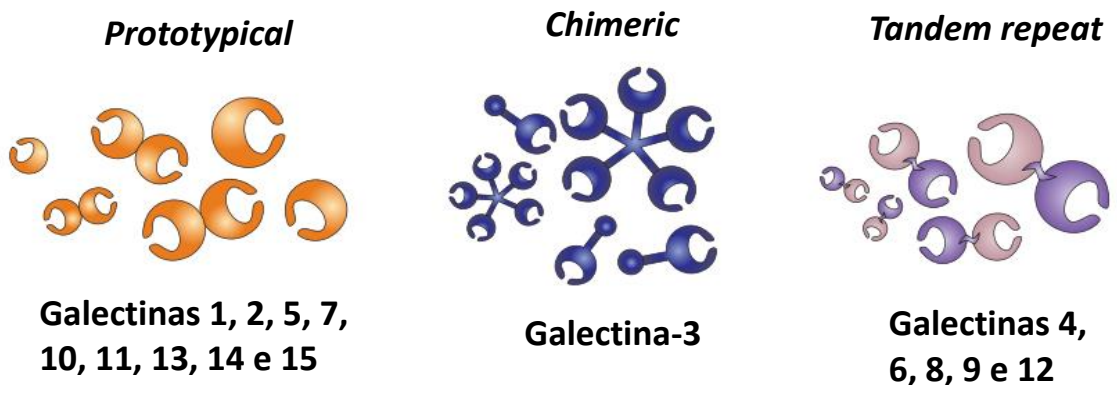
Essas proteínas ligantes de glicanas participam de diversos processos biológicos e/ou patológicos e podem ser expressas por vários organismos como animais, plantas, fungos, bactérias e vírus (KILPATRICK, 2002, SHARON; LIS, 2004). As lectinas, incluindo as de origem animal, são classificadas com base 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).

Também já foi descrito que diversas lectinas, como Con A, PHA, lectinas de plantas (YAMANISHI *et al.*, 2009), de organismos marinhos (ISHIZUKA *et al.*, 2012) e de invertebrados (CAO *et al.*, 2011) induzem a produção de óxido nítrico em macrófagos, bem como secreção de citocinas. Diversas famílias de proteínas endógenas ligantes de glicanas tem sido apontadas numa grande variedade de funções imunológicas incluindo a primeira linha de defesa contra patógenos, tráfego celular, e regulação do sistema imune. Tais proteínas incluem, entre outras, lectinas do tipo C (colectinas, selectinas, receptor de manose e outras), lectinas do tipo S (galectinas), lectinas do tipo I (*siglecs* e outras), lectinas do tipo P (receptores de fosfomanosil), pentraxinas e taquilectinas (RABINOVICH; TOSCANO, 2009). Lectinas são um grupo de glicoproteínas capazes do reconhecimento específico e ligação reversível a padrões de carboidratos de glicoproteínas ou glicolipídeos na superfície de tecidos e células. Portanto, lectinas são não apenas moléculas bioativas interessante, mas também ferramentas úteis em estudos de superfícies celulares, oligossacarídeos e estruturas de glicoconjugados (YAMANISHI *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; BURDETT; HUGHES, 1993, LIU; RABINOVICH, 2010). Essas proteínas que reconhecem β-galactosídeos que contêm preferencialmente seqüências de N-acetillactosaminas, 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, assim como em muitos outros filos, incluindo pássaros, anfíbios, peixes, nemátodes, drosophila, esponjas e fungos (BARONDES *et al.*, 1994, SATO *et al.*, 2009). Enquanto todas

as galectinas compartilham semelhanças em seu CRD, estas também exibem certas diferenças estruturais que permitem classificá-las em 3 diferentes grupos, com base na homologia de suas sequências de aminoácidos: I) *prototypical*, são aquelas que contém um único CRD podem existir em monômeros (galectina-5, -7, -10) ou homodímeros não-covalentes (galectina-1, -2, -11, -13, -14); 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. A galectina-3 é a única que apresenta caractarísticas de uma galectina quimérica, com um CRD e um domínio peptídico que não reconhece β-galactosídeos, porém está envolvido com sua oligomerização.; III) *Tandem-Repeat*, polipeptídeos únicos compostos por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo ligador de 5 a 50 resíduos de aminoácidos, como galectina-4, -6, -8, -9, -12 (CUMMINGS; LIU, 2009, RABINOVICH; TOSCANO, 2009).



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. Adaptado de Rabinovich & Toscano, 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, NOVAK *et al.*, 2014). 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, NOVAK *et al.*, 2014). 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).

As galectinas podem ter sua expressão induzida por estresse (como infecções microbianas) e podem modular o desenvolvimento e a resolução das respostas imunológicas inata e adaptativa. Dessa forma, essas proteínas ligantes de glicanas preenchem os requisitos essenciais para serem consideradas como membros da crescente família dos DAMPs. Tais características incluem sua privilegiada localização citoplasmática, sua via secretória atípica e a habilidade de disparar e/ou modular respostas inflamatórias (SATO *et al.*, 2009)

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 μM (BARONDES *et al.*, 1994, CHO; CUMMINGS, 1995, COOPER; BARONDES, 1999, LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004, RUBINSTEIN *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 µM (CHO; CUMMINGS, 1995), e cada monômero possui um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) idênticos (BARONDES *et al.*, 1994). 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, RABINOVICH *et al.*, 1997, RABINOVICH *et al.*, 1998, RABINOVICH *et al.*, 1999, DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003, LEFFLER *et al.*, 2004, LIU; RABINOVICH, 2005, STOWELL *et al.*, 2010, STOWELL *et al.*, 2014).

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).

A galectina-1 (Gal-1) participa de vários eventos da imunidade inata e adaptativa relacionados a resposta do hospedeiro a infecção experimental por *T. cruzi*. A Gal-1 pode regular negativa ou positivamente a migração de neutrófilos para sítio de inflamação aguda (LA *et al.*, 2003, AUVYNET *et al.*, 2013), e promover a remoção fagocítica destes granulócitos do sítio de inflamação de modo independente de apoptose (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003). Esta proteína pode controlar o tráfico de células T (NORLING *et al.*, 2008), promover a apoptose seletiva de células Th1 e Th17 em função do padrão de glicosilação destas células (TOSCANO *et al.*, 2007), participar do mecanismo regulatório das células Treg naturais (GARIN *et al.*, 2007), e estimular a expansão de células Treg induzíveis (TOSCANO *et al.*, 2006). Ainda, pode induzir a secreção de IL-10 e inibir a liberação de IFN-γ (VAN DER LEIJ *et al.*, 2007, STOWELL *et al.*, 2008, CEDENO-LAURENT *et al.*, 2012). Um possível mecanismo molecular de regulação de células Th1 por galectina-1 envolve a inibição da sinalização da via do NF-kB (TOSCANO *et al.*, 2011). Basicamente, células Th1 ativadas e pró-inflamatórias produzem e secretam Gal-1 via ativação do NF-kB, entretanto, a interação da Gal-1 com glicanas das superfícies de células Th1 ativada bloqueia a liberação de citocina inflamatória via a inibição da via do NF-kB (TOSCANO *et al*., 2011). Curiosamente, a IL-17 produzida por células Th17 pode participar da resolução da infecção experimental por *T. cruzi* por promover a migração de neutrófilos supressores (produtores de IL-10) para o sítio de infecção (TOSELLO BOARI *et al.*, 2012). Nessa linha, foi descrito recentemente que a trans-sialidase de *T. cruzi* inicia um processo de produção de IL-17 por células B ativadas associado a um ligante de Gal-1, a mucina CD45. Entretanto, por meio de experimentos *in vitro*, parece que a Gal-1 endógena não está envolvida neste processo de produção de IL-17, uma citocina envolvida no controle desta infecção parasitária (BERMEJO *et al.*, 2013). Células B ativadas durante a infecção experimental por *T. cruzi* podem causar a apoptose de células T ativadas via a produção e liberação de Gal-1 (ZUNIGA *et al.*, 2001b).

Ainda 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). Recentemente, foi demonstrado que a galectina-1 pode favorecer um padrão de ativação de macrófagos associado a resolução da resposta inflamatório por meio de um mecanismo associado a expressão de lipoxigenase 12/15 (ROSTOKER *et al.*, 2013).

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+. Nessa linha, 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). Outro grupo (BLOIS *et al.*, 2007) demonstrou 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 significantemente a perda fetal. Nessa linha, foi recentemente descrito que a susceptibilidade de mulheres grávidas a diabetes gestacional pode estar associada a polimorfismos gênicos relacionados a perda da função lectínica da galectina-1 ou menor expressão desta lectina (BLOIS *et al.*, 2014). Portanto, esses estudos realizados em vários modelos experimentais têm estabelecido que a Gal-1 tem atividade antiinflamatória e imunorregulatória (LIU; RABINOVICH, 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 (CAMBY *et al.*, 2006, TOSCANO *et al.*, 2006, LIU; RABINOVICH, 2010).

Os macrófagos e as células dendríticas, células apresentadoras de antígeno importantes na evolução da infecção por *T. cruzi*, podem ter suas funções moduladas por Gal-1. Dados da literatura mostram que esta lectina pode diminuir a capacidade de apresentação antigência e a produção de óxido nítrico por macrófagos (CORREA *et al.*, 2003, BARRIONUEVO *et al.*, 2007). Recentemente, Já o tratamento com Gal-1 pode promover a diferenciação de células dendríticas tolerogências capazes de silenciarem as respostas Th1 e Th17 em processo inflamatório autoimunes via a produção de IL-27 e IL-10 (ILARREGUI *et al.*, 2009). Nessa linha, foi demonstrado que animais deficientes do gene da galectina-1 apresentam uma maior susceptibilidade a quebra da tolerância materno-fetal e a manifestação de doenças autoimunes, por apresentarem um perfil imunológico associado a ativação de células Th1 e Th17 (BLOIS *et al*., 2007 ; TOSCANO *et al.*, 2007). Algumas galectinas, como Gal-1 e Gal-3, podem ter suas expressões aumentadas no curso de processos infecciosos/inflamatórios associados a dano tecidual e assim funcionam como marcadores de lesão como as alarminas/DAMP ("*damage-associated molecular pattern*"). E neste contexto essas moléculas podem participar do aumento ou da

regulação da resposta inflamatória frente a processos infecciosos (SATO *et al.*, 2009, MISHRA *et al.*, 2013). Ainda, por serem capazes de reconhecer glicanas de agentes patogênicos podem apresentar um comportamento de PRR (*pattern recognition receptors*) (SATO *et al*., 2009). Recentemente, vários dados da literatura mostram que galectinas podem atuar como sensores de infecção microbiológicas por serem capazes de reconhecer glicanas de patógenos e promover a morte destes agentes e/ou modular a resposta imunológica inata e/ou adaptativa contra estes agentes (STOWELL *et al.*, 2010, SURYAWANSHI *et al.*, 2013, ARASU *et al.*, 2014, STOWELL *et al.*, 2014). Curiosamente, as galectinas, por meio do reconhecimento de carboidratos, podem participar de eventos extracelulares do processo infeccioso, com a adesão e a entrada de microrganismos na célula hospedeira, ou atuar em eventos intracelulares deste processo por meio da interação com glicanas microbianas nos endossomos das células infectadas (CHEN *et al.*, 2014). Além disso, a interação patógeno-hospdeiro poder ser regulada de modo positivo ou negativo pelo reconhecimento de glicanas de agentes infeciosos por galectinas (BAUM *et al.,* 2014).

Apesar da Gal-1 poder participar de diversos aspectos da resposta imunológica do hospedeiro envolvidos na evolução da infecção por *T. cruzi*, pouco se conhece sobre a participação deste lectina animal na fisiopatologia da infecção experimental aguda por *T. cruzi* ou na evolução do mal de Chagas em humanos.

2. Objetivos

- Estudar o efeito da administração de Gal-1 exógena em modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção experimental por *T. cruzi*;
- Investigar a participação da Gal-1 endógena em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* por *T. cruzi*.

3. Material e métodos

3.1 Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica

A galectina-1 (Gal-1) utilizada em nossos estudos foi obtida de culturas de bactérias (*E. coli* cepa M-15) transformadas com plasmídeo PQU-50 contendo o gene completo da galectina-1 humana dimérica. As bactérias utilizadas foram cedidas, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings, chefe do *Biochemistry Department* da *Medicine College* da *Emory University*, Atlanta, Georgia – EUA. A indução da expressão desta proteína pelas bactérias foi feita com 1,5 µM de isopropil β-D-tiogalacto-piranozídeo (IPTG, Sigma-Aldrich) por cerca de quatro horas. Os sobrenadantes brutos das culturas de bactérias contendo a referida lectina foram lisados na presença de inibidores de proteases (*Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail*, Roche Diagnostics), β-mercaptoetanol (Merck), lisozima, DNAse e RNAse (Sigma-Aldrich). O sobrenadante do lisado bacteriano foi então centrifugado (10.000 x g) por 30 minutos à 4ºC. Em seguida, o sobrenadante obtido após a etapa de centrifugação foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose. O material resultante do lisado que não ficou retido na coluna de afinidade (material esse denominado *flow-through*) foi armazenado para análise da qualidade do método de purificação. Já o material retido na coluna, que continha Gal-1, foi eluído com tampão de eluição contendo 14 mM de β-mercaptoetanol e 100 mM de α-lactose (Sigma-Aldrich). Esse processo cromatográfico foi monitorado por leitura de densidade óptica (280 nm) em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu) e eletroforese em gel de poliacrilamida (*Mini-PROTEAN Tetra-cell*, Biorad). As concentrações protéicas das soluções de Gal-1 foram determinadas pelas absorbâncias em 280 nm e estes valores foram convertidos para concentração (mg/mL) com o uso do coeficiente de extinção molar (8970 cm^{-1} M^{-1}) destas moléculas. As frações contendo Gal-1 purificada foram mantidas em tampão de eluição, uma vez que o β-mercaptoetanol e a lactose são necessários para a preservação da atividade da Gal-1 (CHO; CUMMINGS, 1995). Finalmente, as preparações purificadas de Gal-1 foram estocadas a -80ºC até o momento do uso.

Após as etapas de produção e estocagem, as frações de Gal-1 foram alquiladas com o uso de iodoacetamida (Sigma-Aldrich, 200mM para 12 mg de Gal-1) na presença de 100 mM de α-lactose por 24 horas a 4ºC, para manter a

Gal-1 num estado reduzido, o que auxilia na preservação de sua capacidade lectínica (WHITNEY; POWELL; SANFORD, 1986). As frações foram então repurificadas em coluna de exclusão molecular (*PD-10 Desalting column*, GE Healthcare) e incubadas por 4 horas a 4ºC sob leve agitação com 200 µL de polimixina B (Sigma-Aldrich), resina com alta afinidade por lipopolissacarídeos (LPS), a fim de se remover tais resíduos provenientes da etapa de purificação do lisado bacteriano, os quais poderiam levar à manifestação de efeitos biológicos indesejados não-relacionados à Gal-1 (SARTER *et al.*, 2009). Em seguida, a suspensão de Gal-1 e polimixina B foi centrifugada (300 x *g*, 10 minutos) e o sobrenadante recuperado. Por fim, após a etapa de remoção do LPS, as alíquotas de Gal-1 foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) para sua esterilização, aliquotadas e armazenadas a 4ºC para os posteriores experimentos.

3.2 Análise eletroforética de amostras obtidas do procedimento de produção e purificação da galectina-1 recombinante humana

Alíquotas do extrato bruto bacteriano, antes e depois da indução com IPTG, do material do lisado bacteriano que não ficou retido na coluna de agarose-lactose (*flow-through*), e do pico de eluição de Gal-1 obtido após sua purificação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições dissociantes redutoras (*SDS-PAGE*). As amostras foram diluídas na proporção 1:1(v/v) em tampão de amostra redutor Laemmli 2x [0,125 M de Tris base (Vetec), 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Nuclear), 20 % de glicerol (Synth), 10% de β-mercaptoetanol (Merck) e 0,004% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)] e fervidas por 10 minutos. Foram então aplicadas no gel de poliacrilamida a 12,5% usando tampões convencionais contendo 24,8 mM de Tris base, 192 mM de glicina (Ajinomoto) e 0,1% de SDS (Nuclear). Após a corrida (200 V, 140 mA, 120 W), o gel foi corado em solução contendo 0,25% de *Comassie Brillant Blue* (Merck), 50% de metanol (Fmaia) e 7% de ácido acético (Fmaia), por uma hora a 37ºC, sob lenta agitação, e descorado em solução 5% de etanol (Fmaia) e 7% de ácido acético, por cerca de 12 horas, quando foi então fotografado.

3.3 Obtenção de galectina-1 derivatizada com isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Para os ensaios de avaliação da ligação de Gal-1 a superfície de *T. cruzi*, alíquotas de Gal-1 alquiladas com iodoacetamida foram submetidas à conjugação com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Pierce). Para isso, 1 mg de FITC foi diluído em 1 mL de tampão 100 mM carbonato/bicarbonato (Nuclear), pH 9,0, e 10 µL desta solução de FITC foram adicionados a 500 µL de uma solução de Gal-1 em tampão fosfato (*phosphate buffer solution*, PBS) de 1mg/mL, na presença de 100 mM de α-lactose, a fim de impedir que o fluoróforo se conjugasse com resíduos de aminas livres no domínio de reconhecimento de carboidratos, podendo assim comprometer sua atividade lectínica. A solução obtida foi então mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por uma hora, e então submetida a cromatografia de exclusão molecular (PD-10 *desalting column*, GE Healthcare) para remoção de FITC e α-lactose da solução, e obtenção da Gal-1-FITC purificada. A preparação de Gal-1-FITC foi posteriormente utilizada em ensaio de ligação à superfície de *T. cruzi* por citometria de fluxo.

3.4 Análise da atividade lectínica de galectina-1 recombinante humana por ensaio de hemaglutinação

Após a derivatização de galectina-1 com iodoacetamida, o tratamento com polimixina-B para remoção de LPS, filtração para esterilização e/ou derivatização com FITC, a preservação da capacidade da Gal-1 de reconhecer glicanas (atividade lectínica) foi testada através de ensaio de hemaglutinação em placas de 96 poços. Gal-1 liga-se a superfície de eritrócitos humanos (CUMMINGS; LIU, 2009), formando uma “malha” de hemácias, que dessa maneira não se depositam no fundo do poço da placa de 96 poços de fundo em “U”. A aglutinação de hemácias humanas foi realizada na presença de diferentes concentrações de Gal-1, e também na presença de carboidrato hapteno inibidor específico para a galectina-1, a α-lactose (20mM). A sacarose (20 mM) foi usada como carboidrato-controle da reação de inibição da hemaglutnação, uma vez que Gal-1 não apresenta afinidade relevante para essa molécula. As hemácias suspensas apenas em PBS, tampão utilizado no ensaio, ou apenas na presença dos carboidratos lactose ou sacarose, foram consideradas o controle negativo

de hemaglutinação. As soluções de Gal-1 foram diluídas (4, 2, 1, 0.5, 0.250, 0.125, 0.065 µM) e 50 µL de cada uma foram adicionados à 50 µL de suspensão de hemácias humanas a 3% em PBS em placa de 96 poços com fundo em "U". A aglutinação das hemácias foi verificada após 2 horas de incubação. Após as etapas de derivatização e de confirmação da preservação da propriedade hemaglutinante da Gal-1, procedeu-se o armazenamento dessas preparações a 4ºC, até o momento do uso.

3.5 Animais de experimentação

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 selvagens, e C57BL/6 destituídos do gene *tlr4* (TLR-4 KO), fêmeas e adultas, pesando de 25-30 g. A manutenção das formas tripomastigostas de *T. cruzi in vivo* foi realizada em camundongos *Swiss*. 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 C57BL/6 selvagens (WT) foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Já os camundongos C57BL/6 TLR4 KO foram adquiridos junto ao Biotério de Animais Especiais do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB IV) – USP.

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

Formas tripomastigostas de *T. cruzi*, cepa Y, foram cultivadas em culturas de células LLC-MK_2 (*American Type Culture Collection*, ATCC, CCL7.1), segundo procedimento adaptado de Schenkman *et al*., 1991. Garrafas de cultura de 75 cm^2, com culturas sub-confluentes de células LLC-MK_2 foram infectadas com cerca de 10^6 tripomastigotas recém-separadas de sangue de camundongos em fase aguda da infecção com *T. cruzi*. A cultura foi então mantida em meio RPMI (Gibco) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco), 1% de glutamina (Gibco) e 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich) a 37ºC e 5% de CO_2. A separação dos tripomastigotas da cultura foi feita centrifugando-se o sobrenadante a 1000 x *g* por 30 minutos a 4ºC.

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

Em todos os experimentos *in vivo* realizados foram utilizadas formas tripomastigotas das cepas Y 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 (6 a 8 dias após infecção).

3.8 Ligação de Gal-1 marcada com FITC na superfície celular de *T. cruzi*

Para avaliar se Gal-1-FITC era capaz de se ligar à superfície de *T. cruzi*, aproximadamente 10^6 tripomastigotas, obtidas do sobrenadante de culturas recentes de células LLCMK2 infectadas, foram incubadas com quantidades crescentes de Gal-1-FITC (0,5 a 10 μM) por 30 minutos, em banho de gelo, em tubos para citometria de fluxo (Falcon). Após esse tempo, as células foram lavadas uma vez com PBS (1000 x *g*, 10 minutos) e suspensas em 200 µL de PBS. A interação de Gal-1-FITC com a superfície de *T. cruzi* foi analisada por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCanto (BD Biosciences), e os dados foram fornecidos e analisados pelo programa BD FACSDiva (BD Biosciences).

3.9 Avaliação da viabilidade de diferentes formas de *T. cruzi*, após tratamento com galectina-1, por citometria de fluxo

Para analisar se a interação direta da Gal-1 com *T. cruzi* poderia provocar a morte deste parasita, aproximadamente 10^6 tripomastigotas (cepa Y), obtidas do sobrenadante de culturas recentes de células LLCMK2 infectadas, foram tratadas com diferentes concentrações de Gal-1 (1, 5 e 10 µM, preparadas conforme item 3.1) em PBS por uma hora a 37ºC, em tubo para citometria de fluxo (Falcon). Com o objetivo de avaliar o envolvimento da propriedade lectínica de Gal-1 sobre uma potencial ação desta lectina na viabilidade de células de *T. cruzi*, as mesmas concentrações de Gal-1 foram testadas na presença de 20 mM de lactose (carboidrato inibidor) ou na presença de sacarose (carboidrato não-inibidor). Paralelamente, formas epimastigotas (cepa CL) e tripomastigotas (cepas Y e CL) de *T. cruzi* (10^6 formas/poço) foram tratadas com 1, 5 e 10 µM de Gal-1, por 48 horas, para avaliar o efeito direto de Gal-1 sobre diferentes

formas de vida de *T. cruzi*. Após os tratamentos, imediatamente antes da análise por citometria de fluxo, foram adicionados 2 µL de solução de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 mg/mL por tubo de análise. Ainda, células incubadas apenas com o tampão PBS, mantidas nas mesmas condições de tempo e temperatura do ensaio, bem como células submetidas a aquecimento em banho seco a 80ºC por 45 minutos (conforme procedimento adaptado de Boney *et al*., 2013), foram utilizadas como controle negativo e positivo da incorporação de iodeto de propídeo, respectivamente. A incorporação de iodeto de propídeo pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi* frente ao tratamento com Gal-1 foi analisada por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCanto (BD Biosciences), e os dados foram fornecidos e analisados pelo programa BD FACSDiva (BD Biosciences).

3.10. Glicopeptídeos sintéticos de mucinas de *T. cruzi* e imunização de camundongos para obtenção de anticorpos anti-glicopeptídeos sintéticos

Baseando-se em diversos trabalhos da literatura a respeito da estrutura de mucinas na superfície de *T. cruzi* e de células tumorais (CAMPO *et al.*, 2014), 2014), a Dra. Vanessa Leiria Campo, do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sintetizou e gentilmente nos cedeu dois glicopeptídeos derivados de treonina conjugados a proteína carreadora ovalbumina (OVA), NHAc[βGal]-(Thr)2-[αGalNAc]-(Thr)2-[αGlcNAc]-(Thr)2Gly-OVA (**1**) and NHAc[βGal-αGalNAc]-(Thr)3-[αLacNAc]-(Thr)3-Gly-OVA (**2**), que mimetizam glicoproteínas relacionadas e mucinas tanto de *T. cruzi* como de tumores (vide esquema abaixo). Dessa forma, o glicopeptídeo 1 contém unidades de carboidratos αGlcNAc e αGalNAc relacionados a mucinas de *T. cruzi* e tumores, respectivamente, e a unidade βGal, presente em ambas as mucinas, enquanto que o glicopeptídeo 2 possui em sua estrutura os dissacarídeos αLacNAc e βGal-αGalNAc correspondentes a dissacarídeos de *T. cruzi* e tumores.

Uma solução de 10 µg dos glicopeptídeos 1 e 2, conjugados a OVA em PBS, emulsionada com adjuvante completo de Freund (*Complete Freund´s adjuvant*, CFA, Sigma-Aldrich), num total de 200 µL de emulsão, foi injetada em dois diferentes camundongos Balb/c por via peritoneal. Depois de um intervalo de duas semanas, a segunda e a terceira imunizações foram realizadas, desta

vez utilizando adjuvante incompleto de Freund (*Incomplete Freund´s adjuvant*, IFA, Sigma-Aldrich). Após duas semanas da última imunização os camundongos foram eutanasiados, seu sangue coletado e o soro, contendo os anticorpos anti-glicopeptídeos 1 e 2 foi separado, aliquotado e armazenado a -20ºC até o momento do uso. Soros controle com anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-tumor foram preparados imunizando-se outros camundongos com o mesmo protocolo, porém utilizando extrato proteico proveniente da lise de 1 x 10^6 células de *T. cruzi* e de células MCF-7, respectivamente. Os soros anti-glicopeptídeos 1 e 2, bem como os soros controles positivos anti-*T cruzi* e anti-tumor foram testados em relação ao seu reconhecimento específico contra antígenos de *T. cruzi* e MCF-7 por ELISA (*Enzyme-lynked immunosorbent assay*) e por citometria de fluxo, e todos os soros reconheceram os antígenos de superfície de ambas as células comprovando assim seu reconhecimento específico contra moléculas presentes em *T. cruzi* e MCF-7 (vide artigo em anexo).

3.11 Ensaio de inibição da invasão de *T. cruzi* a fibroblastos por galectina-1 e anticorpos anti-glicopeptídeos sintéticos, e análise por *High Content Screening*

Para estudar o efeito de Gal-1 recombinante na entrada de *T. cruzi* em fibroblastos, formas tripomastigotas do parasita, obtidas de culturas de células LLCMK2 infectadas foram lavadas com PBS, e marcadas com 5 µM de CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester* - Sigma-Aldrich) por 30 minutos em banho de gelo. Depois, as células foram lavadas 3 vezes em PBS (700 x *g*, 10 minutos) e então incubadas com 10 µM de Gal-1 recombinante humana purificada em PBS, por 30 minutos em banho de gelo. Paralelamente, células de *T. cruzi*, também marcadas com CFSE, foram incubadas com soro contendo anticorpos anti-mucinas 1 e 2 (descritos no item 3.11) diluído na proporção de 1/50 em PBS, também por 30 minutos em banho de gelo. Após a incubação, os parasitas foram suspensos em 200 µL de meio RPMI sem SBF, adicionados a poços de placa de 96 poços de parede escura e fundo transparente, contendo 1 x 10^5 células LLCMK2 previamente aderidas por 12 horas em meio RPMI com 10% de SBF, na proporção de 5 parasitas para cada fibroblasto, por 2 horas. Após esse período de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL

de PBS para remoção dos parasitas não internalizados, e fixados com 200 µL de PBS contendo 4% de formaldeído. As imagens do experimento foram então capturadas e analisados pela Dra. Luciane Ganiko, especialista em aplicações da empresa *Molecular Devices*, no aparelho *ImageXpress Micro Widefield High-Content Imaging System (Molecular Devices, EUA)*. Dessa forma, além das imagens dos poços obtidas com o filtro adequado para captura da fluorescência de CFSE, foi possível quantificar os campos correspondentes às células de *T. cruzi* no interior dos fibroblastos.

3.12 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos elicitados por tioglicolato

Por via intraperitoneal, foram administrados 2 mL de solução de tioglicolato (Sigma-Aldrich) estéril a 3% (m/v) em camundongos C57BL/6 selvagens e/ou destituídos do gene do TLR-4 (TLR4 KO). Após 4 dias, os animais foram devidamente anestesiados com solução de xilasina/ketamina (Dopalen Vetbrands/Dopaser Hertap Caller) (10mg/kg+100mg/kg), e o exsudato peritoneal foi coletado pela injeção de cerca de 4 mL de PBS estéril gelado com auxílio de agulha e seringa estéreis. As células assim obtidas foram coletadas em tubo cônico de 50 mL e lavadas com PBS gelado (300 x *g*, 5 minutos, 4ºC), suspensas em meio RPMI completo (RPMI-C), contadas em câmara de Neubauer e distribuídas na concentração de $5x10^5$ células/500 µL por poço em placas de culturas de células com 24 poços. Após 2 horas de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS para remoção das células não-aderentes, e foram realizados os procedimentos de infecção. Em alguns experimentos, as células peritoneais obtidas foram plaqueadas sobre lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro estéril, para que o material pudesse ser fixado e corado para posterior análise.

3.13 Estudo do impacto de Gal-1 sobre a atividade fagocítica (ou de captura) de *T. cruzi* por macrófagos peritoneais

Para avaliação do efeito da Gal-1 na infecção de macrófagos *in vitro*, formas tripomastigotas, obtidas do sobrenadante de culturas recentes de células LLCMK2 infectadas, foram incubadas na presença de 10 µM de Gal-1 (preparada conforme item 3.1) diluída em meio RPMI-C (ou apenas em meio RPMI-C com

o mesmo volume de PBS utilizado para Gal-1) por uma hora, a 37ºC 5 % CO_2. Os parasitas então foram lavados em PBS (1000 x *g*, 10 minutos, 4ºC) e adicionados na concentração de $1,5x10^6$ tripomastigotas/200µL/poço de placa de 24 poços contendo $5x10^5$ macrófagos peritoneais (uma proporção de 3 parasitas:1 macrófago), também na presença de 10 µM de Gal-1 ou apenas meio RPMI-C. As placas foram então incubadas novamente em estufa a 37ºC e 5% de CO_2 por uma hora ou por quatro horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado, os poços lavados duas vezes com PBS, e o material sobre a lamínula de vidro foi fixado e corado com corante Panótico Rápido® (Laborclin). A contagem da porcentagem de macrófagos infectados em cada lamínula foi determinada por microscopia óptica.

3.14 Efeito do tratamento com galectina-1 na capacidade tripanocida de macrófagos peritoneais

Para avaliação do efeito da Gal-1 na capacidade tripanocida de macrófagos *in vitro*, formas tripomastigotas, obtidas do sobrenadante de culturas recentes de células LLCMK2 infectadas, foram incubadas na presença de 10 µM de Gal-1 (preparada conforme item 3.1) diluída em meio RPMI-C (ou apenas em meio RPMI-C com o mesmo volume de PBS utilizado para Gal-1) por uma hora, a 37ºC 5 % CO_2. Os parasitas então foram lavados em PBS (1000 x *g*, 10 minutos, 4ºC) e adicionados na concentração de $1,5x10^6$ tripomastigotas/200 µL/poço de placa de 24 poços contendo $5x10^5$ macrófagos peritoneais (uma proporção de 3 parasitas:1 macrófago), também na presença de 10 µM de Gal-1 ou apenas meio RPMI-C. As placas foram então incubadas novamente em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Após esse período de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS para retirada das formas tripomastigotas não-fagocitadas (ou capturadas), a cada poço foram adicionados 500 µL de meio RPMI-C, na presença ou não de 10µM de Gal-1, e incubado por 5 dias em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Diariamente, a partir do segundo dia de infecção, o sobrenadante de cada poço foi coletado e nova solução de meio com ou sem 10 µM de Gal-1 foi adicionado aos poços. O sobrenadante coletado foi centrifugado (1000 x *g*, 10 minutos) para separação das formas tripomastigotas liberadas. O sobrenadante obtido foi armazenado a -80ºC para posteriores dosagens de

nitritos, e os parasitas liberados e centrifugados foram ressuspensos em PBS com 0,1% azul de tripan (Vetec) e 1% formaldeído (Rioquímica) para posterior contagem por microscopia óptica em câmara de Neubauer.

3.15 Dosagem de nitritos (NO_2^-) em sobrenadantes de cultura de células

O óxido nítrico (NO) produzido pelas células fagocíticas é uma molécula instável, e em cultura rapidamente se transforma em nitritos (NO_2^-). Para determinar os níveis de óxido nítrico produzido após a infecção por *T. cruzi* na presença ou ausência de Gal-1, a concentração de nitritos foi determinada nos sobrenadantes dessas culturas celulares através da reação de Griess (GILLIAM *et al.*, 1993, VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). Brevemente, adicionou-se 50 µL de cada sobrenadante a ser testado em triplicata numa placa de ELISA de 96 poços (Costar), e em seguida adicionou-se 50 µL do reagente de Griess [mistura 1:1 (v/v) de 0,1% de *N*-(1-naftil)etilenodiamina dihidrocloreto (*NEED*, Sigma-Aldrich) em água: sulfanilamida (Sigma-Aldrich) a 1% em ácido fosfórico (Sigma-Aldrich) 3%] em cada poço. Após cerca de 5 minutos, foi feita a leitura da absorbância do produto formado em 554 nm em espectrofotômetro. Uma curva de calibração feita com concentrações conhecidas de nitrito de sódio ($NaNO_2$, Sigma-Aldrich) diluídas em RPMI-C foi feita em duplicata para encontrar a concentração de nitritos das amostras testadas. Meio RPMI-C foi utilizado como branco da reação.

3.16 Avaliação da presença de LPS em amostras de galectina-1 por meio do ensaio de produção de óxido nítrico por macrófagos

As preparações de Gal-1 purificadas por cromatografia de afinidade em agarose-lactose foram tratadas com polimixina-B-agarose com a finalidade de remover uma possível contaminação residual por LPS, uma vez que a Gal-1 foi obtida de bactérias Gram-negativas, como descrito por Sarter e colaboradores (2009). Com o objetivo de checar se estes procedimentos de cromatografia de afinidade (agarose-Lactose e agarose-polimixina-B) foram eficientes em eliminar o LPS, preparações de Gal-1 foram submetidas ao ensaio de indução de óxido nítrico por macrófagos na presença de baixas concentrações de IFN-γ. Este ensaio tem como princípio o uso de baixas concentrações de LPS e IFN-γ que são insuficientes para induzir a produção detectável de óxido nítrico em macrófagos, mas eficientes quando testadas simultaneamente. O ensaio foi

realizado conforme procedimento padronizado no Laboratório do Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes (Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo), um de nossos colaboradores. Basicamente, camundongos C57BL/6 selvagens ou destituídos do gene do *toll-like receptor-4* (TLR4 KO) foram injetados intraperitonealmente com 1 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3%. Após 3 dias, os macrófagos elicitados foram coletados das cavidades peritoneais por lavagem com PBS gelado, lavados e suspensos em meio RPMI completo para sua contagem. Em seguida, $1x10^4$ células em 100 µL/poço de meio RPMI completo foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços, e mantidas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2 e decorridas 2 horas as células não-aderentes foram removidas por lavagens com PBS gelado. Após esta etapa, os tratamentos das células aderentes obtidas de ambas linhagens de camundongos foram iniciados e incluíram Gal-1 na concentração de 10 µM; apenas IFN-γ na concentração de 5 ng/mL, e diferentes concentrações de Gal-1 (10 a 0,00001 µM) na presença de 5 ng/mL de IFN-γ. Ainda, macrófagos obtidos de animais selvagens ou *tlr-4*$^{-/-}$ foram incubados apenas com o meio de cultura ou com diferentes concentrações de LPS ultra-puro (10 pg/mL a 100 ng/mL) e IFN-γ (5 ng/mL). As culturas foram mantidas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2 por 48 horas. Finalmente, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80ºC para posterior dosagem de nitritos pelo método de Griess (GILLIAM *et al*., 1993; VESPA *et al*., 1994).

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

Camundongos C57BL/6 selvagens e/ou destituídos do gene do TLR-4 (TLR4 KO) foram infectados intraperitonealmente com 1000 tripomastigotas obtidas do sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*, cepa Y, e suspensos em 200 µL de PBS estéril. Um grupo de 4 animais WT e um grupo de 4 animais TLR-4 KO foram tratados 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. Outros dois grupos, um com 4 animais WT e outro com 4 animais TLR4 KO com mesma idade e peso, também infectados, receberam 200 μL de PBS, obedecendo a mesma escala de tratamento citada. A parasitemia dos animais foi determinada do 5º ao 14º dia após a infecção.

3.18 Avaliação da parasitemia

O número de parasitas no sangue circulante foi determinado em diferentes dias após a infecção de acordo com o método previamente descrito (MELO; BRENER, 1978). Brevemente, 5 μL 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 5º ao 14º dias de infecção, de acordo com o esquema ilustrado anteriormente. Já a taxa de sobrevivência foi observada diariamente, por 50 dias, para camundongos WT e KO Gal-1 infectados com 10 000 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, também por via intraperitoneal.

3.19 Infecção de camundongos C57BL/6 destituídos (KO Gal-1) ou não (WT) com *T. cruzi*

Camundongos C57BL/6 fêmeas, com peso entre 25 e 30 g, destituídos (KO Gal-1) ou não (WT) do gene da galectina-1 foram 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 5 animais por grupo experimental. A parasitemia de ambos os grupos foi acompanhada do 5º ao 14º dias de infecção. Passados 20 dias, os animais foram eutanasiados, o soro total separado e armazenado a -80ºC, o baço removido para uso em cultura celular, e o coração removido para extração de DNA genômico, sendo o restante do tecido congelado a -80ºC para posteriores experimentos.

3.20 Perfil diferencial de leucócitos circulantes no sangue, e perfil da população celular no peritônio de animais infectados por *T. cruzi*

Para obtenção de um perfil dos leucócitos circulantes no sangue de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e destituídos do gene para Gal-1 (KO Gal-1) infectados com *T. cruzi*, uma amostra de cerca de 5 µL de sangue da cauda desses animais foi coletada, no mesmo momento da coleta de sangue para análise de parasitemia, nos dias 5, 7, 9, 12 e 14 após a infecção (período que engloba desde quando os parasitas surgem no sangue, o pico de parasitemia, e seu desaparecimento da circulação por conta da chegada aos tecidos musculares). Essa gota de sangue foi então depositada em uma lâmina de vidro limpa, e rapidamente espalhada em sua superfície com o auxílio da borda de outra lâmina. Após secagem, o material foi fixado e corado com o kit de coloração Panótico Rápido (Laborclin, Brasil), e a contagem diferencial de 100 leucócitos na lâmina percorrida foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico comum.

O perfil de células imunológicas que migram para o peritônio logo após a infecção dos C57BL/6 WT e KO Gal-1 com *T. cruzi* nesta cavidade também foi avaliada. Para tanto, os animais infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram devidamente eutanasiados em diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 horas após a infecção), e o lavado de sua cavidade peritoneal foi obtido pela injeção de cerca de 5 mL de PBS estéril gelado na cavidade, posteriormente sendo coletado com auxílio de seringa e agulha. As células assim obtidas foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4ºC, lavadas novamente com PBS gelado, e as células presentes em 50 µL desta suspensão foram sedimentadas em uma lâmina de microscopia óptica com auxílio de uma centrífuga de lâminas (*Shandon Cytospin*). Após secagem do material, as células foram fixadas e coradas com kit Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) e a porcentagem de cada célula determinada com auxílio de um microscópio óptico comum.

3.21 Histopatologia e análise do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco

Fragmentos do tecido cardíaco de camundongos WT e KO Gal-1 infectados por 14 e 21 dias com *T. cruzi* foram fixados em solução Methacarn (60% v/v metanol, 30% v/v clorofórmio 10% v/v ácido acético) por 24 horas, e então embebidos em parafina. Seções de 5 µm de espessura cortadas em

micrótomo foram coradas com hematoxilina e eosina para os procedimentos histológicos. As imagens do infiltrado inflamatório tecidual foram capturadas por uma câmera fotográfica digital acoplada a um microscópio óptico Olympus BX51. As áreas de tecido prejudicado são definidas como as áreas com fibras musculares danificadas e acúmulo de células inflamatórias.

3.22 Dosagem da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) em tecido cardíaco

Uma maneira indireta de quantificar algumas células infiltradas em tecidos é a identificação de certos marcadores ou dosagem de atividade de enzimas específicas de cada tipo celular no extrato do tecido analisado. Para tanto, a quantificação das enzimas mieloperoxidase e N-acetyl-β-D-glucosaminidase, enzimas predominantes em neutrófilos e macrófagos, respectivamente (AYALA *et al.*, 2000) é uma metodologia fácil e rápida para a detecção dessas células no tecido cardíaco. Dessa forma, o coração de camundongos C57BL/6 WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14 dias foi removido cirurgicamente, lavado em PBS, pesado e cortado em pequenos pedaços dentro de um tubo de 2 mL, mantido sempre em gelo. Em seguida, 400 µL de tampão fosfato foi adicionado ao tecido cortado, para então ser completamente triturado em homogeneizador de tecidos. A suspensão foi centrifugada a 1700 x g por 15 minutos a 4ºC, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de tecido foi suspenso novamente em tampão fosfato, e adicionada uma solução de NaCl a 0,2 % (m/v) gelada ao homogenato, a fim de lisar as hemácias presentes. Após 30 segundos, foi adicionada uma solução de NaCl a 1,6% (m/v) com 5% de glicose (m/v) para tornar a concentração de NaCl próxima a níveis fisiológicos novamente, agitando-se levemente. O homogenato foi novamente centrifugado para descarte do sobrenadante, suspenso em tampão fosfato com 0,5% (m/v) de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) agitado vigorosamente com auxílio de um agitador do tipo vórtex. Em seguida, o material foi congelado e descongelado 3 vezes, mergulhando-se os tubos em nitrogênio líquido e aquecendo-os em banho-maria a 37ºC. Por fim o homogenato foi centrifugado a cerca de 10 000 x g por 15 minutos a 4ºC, e o sobrenadante foi estocado para as dosagens de mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glicosaminidase.

A dosagem de mieloperoxidase é feita colocando-se 50 µL de cada sobrenadante obtido da homogeneização do tecido cardíaco num poço de placa de 96 poços. Em seguida, adiciona-se 50 µL de solução de TMB (tetrametilbenzidina, um substrato da mieloperoxidase), e aguarda-se 30 minutos, mantendo a placa no escuro a 37ºC. A reação é interrompida adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico a 4 M em cada poço, e a absorbância obtida em 450 nm é proporcional à atividade de mieloperoxidase no tecido avaliado. Para se obter a atividade de mieloperoxidase por grama de tecido, divide-se a leitura obtida a 450 nm após descontar o valor do branco, e pela massa total do tecido que foi homogeneizado.

Por fim, a dosagem de N-acetil-β-D-glicosaminidase é feita transferindo-se 25 µL de extrato de tecido cardíaco num poço de placa de 96 poços. Em seguida adiciona-se 25 µL de NAG (p-nitrofenil-2-acetamida-β-D-glicopiranosídeo) e 100 µL de tampão citrato, e incuba-se a placa no escuro a 37ºC por uma hora. A reação é interrompida adicionando-se 100 µL de tampão glicina em cada poço, e a leitura de absorbância em 405 nm é equivalente à atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase na amostra de tecido. Da mesma forma para a mieloperoxidase, a atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase por grama de tecido é obtida divindo-se a leitura obtida a 405 nm após descontar o valor do branco, pela massa total do tecido que foi homogeneizado.

3.23 Imunofenotipagem de leucócitos infiltrados no tecido cardíaco por citometria de fluxo

Para a imunofenotipagem do infiltrado de células inflamatórias no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14 e 21 dias, os órgãos inteiros foram coletados e, com exceção das partes destinadas à extração de DNA e dosagem de citocinas, foram lavados com PBS, triturados com auxílio tesouras cirúrgicas pequenas, e então tratados com 0,05 mg/mL de colagenase do tipo II (*Colagenase Type II from* Clostridium hystoliticum – Gibco *by* Life Biosciences) diluída em PBS, por 1 hora, a 37ºC. Após esse período, os tecidos foram submetidos a separação em membranas de 40 µm (*Cell Strainer 40 µm*, BD Falcon) e então a suspensão obtida foi centrifugada a 50 x g por 5 minutos, para remoção de debris teciduais. As células em suspensão contendo linfócitos de cada animal, já separadas em dois tubos

diferentes, específicos para citometria de fluxo, foram lavadas em 1 mL de PBS, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos, e então tratadas com 100 µL da solução de anticorpos anti-FcRγ/Fc block (BD Biosciences, USA), deixando incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram novamente lavadas em PBS, e então foram adicionados 100 µL dos anticorpos anti-CD3 (*APC Hamster anti-mouse CD3,* BD Biosciences, USA), anti-CD4 (*PerCP Rat anti-mouse CD4,* BD Biosciences, USA) e anti-CD8 (*PE Cy7 Rat anti-mouse CD8,* BD Biosciences, USA) (em um tubo, correspondente aos linfócitos T) e os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 (*PE Cy7 Rat anti-mouse CD25,* BD Biosciences, USA) (outro tubo, correspondente à marcação para células T regulatórias), todos diluídos numa concentração de 0,10 µg/100 µL de solução em PBS, deixando-se incubar por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo de luz. Após novo passo de lavagem, as células correspondentes aos linfócitos T foram fixadas com solução de 2% v/v de formaldeído em PBS, e armazenadas a 4ºC até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

Já os tubos correspondentes às células T regulatórias, após marcação das moléculas de superfície e um passo de lavagem, foram fixados com 2 mL de *Mouse FoxP3 Fixation Buffer 20 x* (BD Biosciences) diluído imediatamente antes do uso em PBS, por 30 minutos a 4ºC, no escuro. Então, foram centrifugadas para descarte do tampão de fixação, lavadas com 2 mL de *Mouse PoxP3 Permeabilization Buffer 5 x* (BD Biosciences) diluído em PBS imediatamente antes do uso e aquecido, e permeabilizadas por 30 minutos a 37ºC com 2 mL deste mesmo tampão. As células foram então centrifugadas para retirar o tampão de permeabilização, lavadas mais duas vezes com PBS, e então incubadas com anticorpo anti-FoxP3 (*Alexa Flour-488 Rat anti-mouse FoxP3*, BD Biosciences), numa concentração de 0,10 µg/100 µL de solução em PBS, por 20 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Finalmente, as células forma lavadas mais duas vezes com 1 mL de PBS, suspensas em solução a 2% (v/v) de formaldeído em PBS, e armazenadas a 4ºC até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACS Canto (BD Biosciences) e as análises serão realizadas através do software FACS Diva (BD Biosciences).

3.24 Preparação de extrato tecidual e dosagens de citocinas em soro e tecido cardíaco de camundongos

Após serem devidamente anestesiados, o sangue periférico total de camundongos C57BL/6 WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14 e 21 dias foi coletado e seu soro separado. Os tecidos cardíacos desses animais foram coletados, pesados, e então cerca de 50 mg de tecido foram coletadas e imersas num volume de PBS (500 µL) contendo coquetel de inibidores de protease (*Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail*, Roche Diagnostics). A solução inibidora de protases foi preparada dissolvendo-se um tablete do coquetel em 50 mL de PBS, de acordo com as instruções de fabricante. Os extratos teciduais no tampão de inibidor de proteases foram obtidos por processamento num homogeneizador de tecidos, seguido por centrifugação a 300 x g por 15 minutos e posterior armazenamento dos sobrenadantes obtidos a – 80ºC até a realização das dosagens (Borges *et al*., 2013). Os soros coletados desses mesmos animais também foram armazenados nessas condições. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN-γ, IL-10 e IL-17A foram dosadas utilizando o sistema *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit,* de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, extratos de tecido cardíaco armazenados a -80ºC foram rapidamente descongelados e, então, a 50 µL de cada amostra, foram adicionados um mix de *beads* anti-citocinas e incubadas com o reagente de detecção marcado com PE (*phycoerythrin*, ou ficoeritrina, um fluoróforo). As *beads* e o reagente de detecção também foram incubados com diluições seriadas de padrões de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN-γ) providas pelo fabricante. As amostras e padrões de citocinas foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas. As amostras foram então lavadas com tampão fornecido pelo kit e analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences), e os dados analisados pelo *CBA analysis software* (BD Biosciences). As dosagens de citocinas foram normalizadas levando em consideração o peso de cada tecido coletado, e os resultados foram expressos como picogramas de citocina por miligrama de tecido.

3.25 Determinação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real

Camundongos C57BL/6 WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14, 21 e 28 dias, foram eutanasiados e o músculo cardíaco removidos cirurgicamente. Os tecidos foram lavados em PBS e então cerca de 30 mg de cada tecido foram submetidos à extração de DNA genômico utilizando-se o kit *Illustra™ Tissue and cell genomicPrep mini spin kit* (GE, USA), segundo orientação do fabricante. O DNA assim obtido foi eluído em água livre de nucleases, dosado em aparelho *NanoDrop ND 2000* (Thermo Scientific, USA) e mantido a -20ºC. Para controle positivo da reação foi utilizada amostra de DNA genômico de10^8 tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas de cultura de fibroblastos, a partir da qual foi feita uma diluição seriada em água livre de nucleases, de forma a se obter uma curva padrão de DNA de parasitas, com pontos correspondentes a 500 000, 50 000, 5 000, 500 e 50 parasitas por µL de DNA. Foi ainda extraído o DNA de 30 mg de tecido de um coração de camundongo não-infectado com o mesmo kit descrito anteriormente, como controle negativo de reação. A amplificação foi realizada em um volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico *SYBrGreen Master Mix* (Thermo Scientific, USA), 0,35 µM de cada primer especifico para DNA genômico de *T. cruzi* (TCZ-F: 5'-GCTCTTGCCCACAAGGGTGC-3' e TCZ R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') (CUMMINGS; TARLETON, 2003), 10 ng de DNA de cada uma das amostras e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar o volume de 10 µL. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real *StepOne™ Real time PCR System* (Life Technologies, USA) foi utilizado para obtenção dos valores de C_T. A normalização da quantidade de DNA aplicada foi feita pela amplificação do gene murino para β-actina (B-actina-F: 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3' e B-actina-R: 5'-ACAGCGAGGCCAGGATGGA-3'). Os ciclos foram programados da seguinte forma: desnaturação inicial a 95ºC por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94ºC por 15 segundos e 64.3ºC por 1 minuto, com aquisição de fluorescência em 64.3ºC. A amplificação foi seguida imediatamente por uma determinação de curva de *melting*, com desnaturação inicial de 15 segundos a 95ºC, resfriamento a 60ºC por 1 minuto e então aumento de temperatura gradual em incrementos de 0.3ºC/s de 60 a 95ºC. (CUMMINGS; TARLETON, 2003, CALDAS *et al.*, 2012).

As análises foram feitas em cerca de 5 animais, provenientes de 3 experimentos diferentes.

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

As células da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 destituídos (KO Gal-1) ou não (WT) do gene da galectina-1 foram obtidas pela injeção de 4 mL de meio RPMI-C no peritôneo 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 10°C. Ao final da segunda lavagem as células foram suspensas em meio RPMI-C e contadas. Uma concentração de 5 x 10^5 células/500 µL/poço foram distribuídas em placa de 24 poços e incubadas em estufa de CO_2 por 24 h a 37ºC, em atmosfera úmida com 5% de CO_2. 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 $LLCMK_2$ (3 parasitas:1 macrófago) foram suspensas em 500 µL de meio RPMI-C, colocadas nos poços e incubadas por mais 3 horas (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 suspenso 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.

3.27 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 5 Prism, GraphPad, USA).

4. Resultados

4.1 Obtenção e purificação de galectina-1 humana dimérica

As preparações de galectina-1 recombinante humana dimérica purificada (Gal-1) para utilização nos experimentos posteriores foram obtidas por cromatografia de afinidade em colunas de agarose-lactose, a partir do sobrenadante de extratos lisados de bactéria transformadas com o fragmento gênico contendo a fase de leitura aberta do gene da Gal-1 e tratadas com o indutor de expressão gênica adequado (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo, IPTG). A produção média da Gal-1 purificada foi de 40 mg/litro de cultura de bactérias. O perfil da cromatografia de afinidade, monitorado pela densidade óptica das frações obtidas em 280 nm, é mostrado na Figura 1. Considerando que a Gal-1 perde sua capacidade de reconhecimento de carboidratos na ausência de seus ligantes e/ou agentes redutores (CUMMINGS; LIU, 2009) 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). Antes do uso, as preparações de galectina-1 foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (*PD-10 Desalting Column, GE Health Care Life Sciences, EUA*) para remoção da lactose e do 2-ME. Este procedimento foi acompanhado por leitura da absorbância em 280 nm (Figura 2A). Em seguida, para preservar a atividade lectínica de Gal-1, as preparações obtidas após a retirada da lactose e do 2-ME foram tratadas com iodoacetamida na presença de lactose, a fim de evitar sua oxidação (WHITNEY; POWELL; SANFORD, 1986). Para a retirada da iodoacetamida livre e da lactose da solução de Gal-1, nova cromatografia de exclusão molecular (PD-10) foi realizada, cujo perfil cromatográfico encontra-se na Figura 2B. Ao final deste procedimento, as preparações de galectina-1 foram submetidas a cromatografia em colunas de agarose-polimixina B para remoção de LPS e esterilizadas por filtração em membranas de 0,22µm e estocadas à 4ºC até o momento do uso. A análise eletroforética de uma preparação de Gal-1 purificada, estéril, livre de LPS e alquilada encontra-se ilustrada na Figura 3A. Observa-se um elevado grau de homogeneidade nas preparações de Gal-1, pois foi possível detectar apenas uma banda proteica com massa molecular aparente de 15 kDa. Além disso, esta banda proteica foi detectada apenas nos extratos de bactérias submetidas a tratamento com o IPTG (Figura 3A, pista NI). Já a

análise da corrida eletroforética do material que não foi retido na coluna de agarose-lactose, denominado *Flow-Through* (pista FT), mostrou a ausência de banda proteica de 15 kDa neste material. Enquanto que, no material retido na agarose-lactose e eluído com este açúcar (pista Gal-1) foi possível detectar uma banda única próxima a localização do marcador de 15 kDa, o que sugere a eficiência do método de purificação. Assim, afirma-se que a Gal-1 produzida apresentou-se com sua atividade lectínica preservada, uma vez que no material FT não foi detectada a banda correspondente a Gal-1 (Figura 3A). Experimentos de *Western-blotting,* usando um anticorpo monoclonal anti-galectina-1 (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2010) mostraram que a banda proteica de 15 kDa corresponde a forma monomérica dessa lectina, o que foi também confirmado por espectrometria de massas (dados não mostrados). Desta forma, a estratégia de purificação da galectina-1 foi eficiente, pois apenas com uma etapa de purificação foi possível obter preparações Gal-1 ativa e com alto grau de homogeneidade a partir do extrato bruto bacteriano. A confirmação da atividade lectínica desta proteína após as etapas de purificação, retirada de LPS e alquilação foi feita por ensaio de hemaglutinação, uma vez que ela se liga a glicanas de eritrócitos humanos relacionadas ao sistema ABO (CUMMINGS; LIU, 2009). Brevemente, diferentes concentrações de Gal-1 foram incubadas com suspensão de hemácias humanas a 3% (v/v) em tampão PBS, na presença de lactose 20 mM (Figura 3B, primeira linha), sacarose 20 mM (Figura 3B, segunda linha), e apenas Gal-1 (Figura 3B, terceira linha), por uma hora. Suspensões de hemácias somente com o PBS e/ou os carboidratos utilizados também foram utilizados como controles (últimos poços de cada linha). A atividade lectínica desta proteína se comprova pela aglutinação das hemácias nos poços contendo de 4 a 1 µM Gal-1 na ausência de carboidratos ou na presença de sacarose (Figura 3B, segunda e terceira linhas). A presença de lactose nos poços com as mesmas concentrações de Gal-1 inibe a atividade hemaglutinante desta lectina, uma vez que lactose se liga ao CRD, impedindo o reconhecimento de glicanas das superfícies dos eritrócitos (INAGAKI *et al.*, 2000), fazendo com que as hemácias se depositem no fundo do poço. Os resultados obtidos nesta fase do trabalho estavam de acordo com relatos da literatura (INAGAKI *et al.*, 2000, DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003, MIURA *et al.*, 2004) e forneceram subsídios necessários para a continuidade do trabalho. Assim,

todos os demais experimentos foram realizados com preparação de Gal-1 recombinante humana dimérica homogênea, alquilada, ativa, estéril, livre de LPS e de seus preservantes.

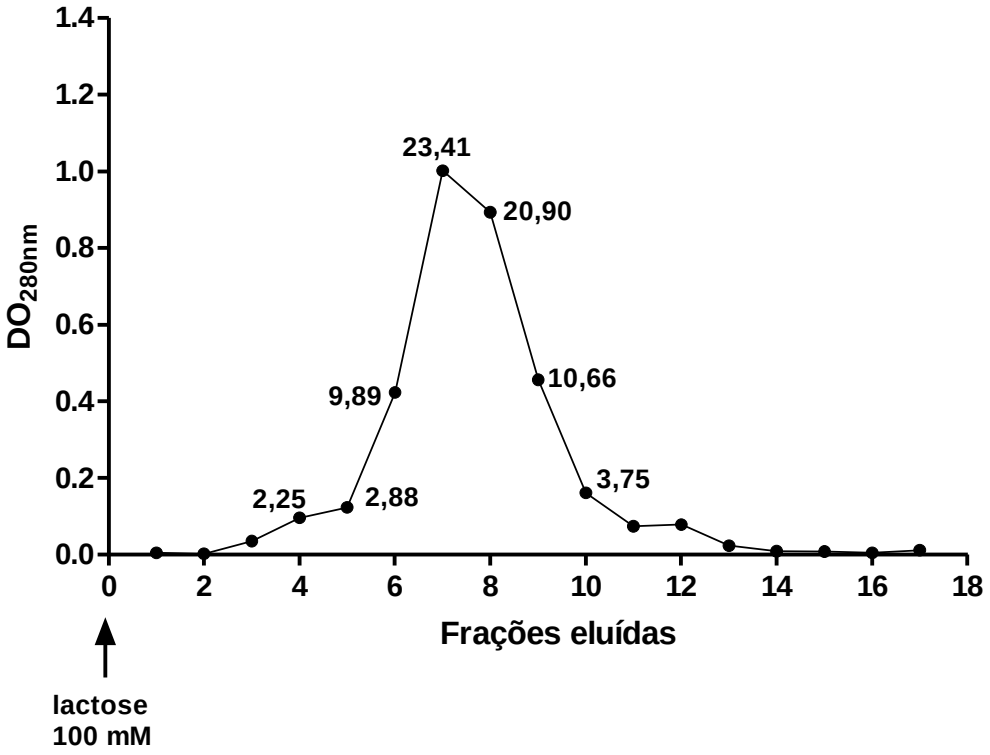


Figura 1 – Perfil cromatográfico referente à purificação de Gal-1 em resina de agarose-lactose. Foram obtidos aproximadamente 40 mg de galectina-1 recombinante humana por litro de cultura bacteriana. Os extratos bacterianos foram aplicados em uma coluna com resina de agarose-lactose e o material retido foi eluído com PBS acrescido de lactose (100 mM) e 2-ME (14 mM). As frações cromatográficas foram monitoradas por absorbância em 280nm. A concentração protéica das frações foram calculadas com o uso do coeficiente de extinção molar da Gal-1 (8970 $cm^{-1}M^{-1}$) e expressa em mg/mL. Os números em destaque nos gráficos

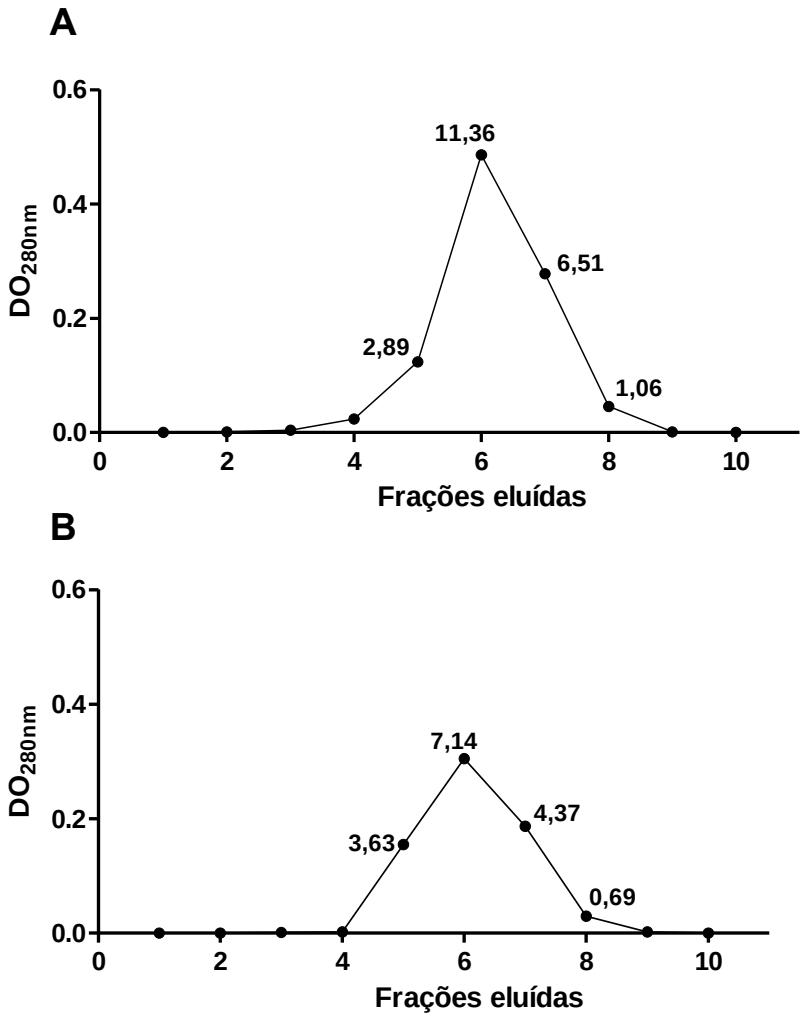


Figura 2 – Perfis cromatográficos referentes à remoção de preservantes (Lactose, 2-ME e iodoacetamida) de preparações de Gal-1 purificada. A Gal-1 purificada teve sua atividade lectínica preservada pelo uso de lactose (100mM) e 2-ME (14mM) em suas preparações ou por sua alquilação com iodoacetaminda. A remoção destes preservantes das preparações de Gal-1 foi feita por cromatografia de exclusão molecular (PD-10), antes do uso experimental desta lectina. Os perfis cromatográficos de preparações com lactose e 2-ME ou alquiladas estão indicados nos painéis A e B, respectivamente. As frações cromatográficas foram monitoradas por absorbância em 280nm. A concentração protéica das frações foram expressas em mg/mL. Os números em destaque nos gráficos referem-se à concentração de Gal-1 (em mg/mL) de cada fração obtida.

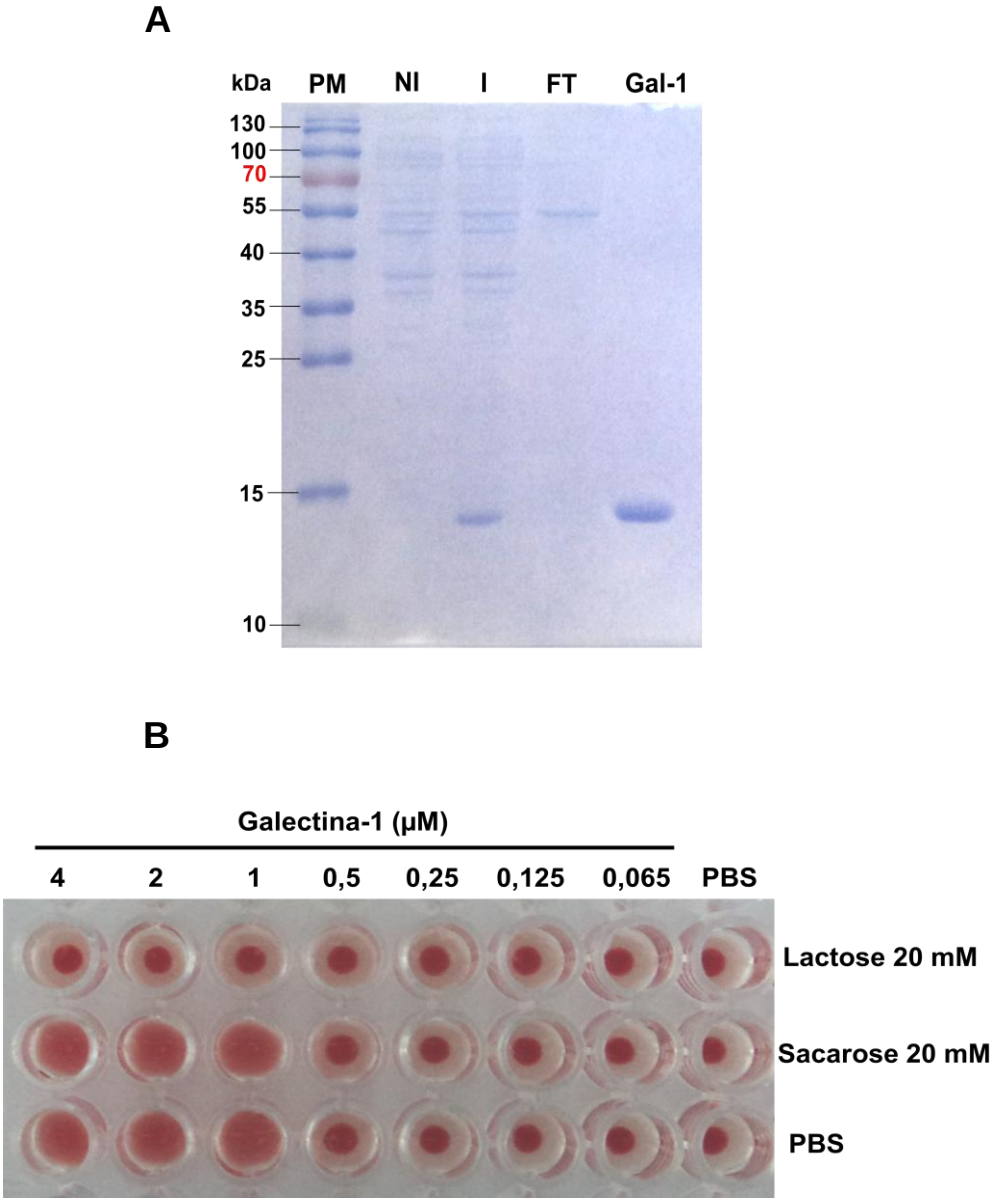


Figura 3 – Perfil eletroforético e atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1 purificada, alquilada, estéril e livre de LPS e preservantes. Eletroforese do tipo SDS-PAGE em condições redutoras e dissociantes das frações do extrato bacteriano e da proteína purificada coletadas durante as etapas de produção de Gal-1 (A). PM: padrão de massa molecular (130 a 10 kDa); NI: extrato bacteriano não-induzido; I: extrado bacteriano após indução com IPTG; FT: material do lisado bacteriano não-retido na coluna de afinidade agarose-lactose (*Flow-Through*); Gal-1: fração do material retido na coluna e eluído com lactose contendo Gal-1 purificada. Nota-se a presença de banda protéica de massa molecular aparente de aproximadamente 15 kDa no extrato bacteriano induzido (I), correspondente a Gal-1, que não é detectada no material do lisado não-retido (FT). Após derivatização com iodoacetamida, eliminação de preservantes, remoção de LPS e filtração em 0,22 µm, diferentes concentrações de Gal-1 foram submetidas a ensaio de hemaglutinação (B), na presença de lactose, sacarose e só tampão PBS. Nota-se a aglutinação das hemácias nas concentrações de 1 a 4 µM de Gal-1, o que não ocorre na presença do carboidrato inibidor, a lactose.

4.2 A interação de galectina-1 com a superfície de *T. cruzi* é dependente da propriedade lectínica desta proteína

Alíquotas de Gal-1 foram acopladas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) na presença de lactose, para impedir a ligação deste fluoróforo ao seu domínio de reconhecimento de carboidratos, preservando a sua capacidade de reconhecer glicanas. Moléculas de FITC e lactose presentes na solução foram removidas por cromatografia de exclusão molecular (PD-10) (dados não mostrados). Diferentes concentrações de Gal-1 conjugada ao FITC (Gal-1-FITC) foram incubadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e submetidas à análise por citometria de fluxo para detecção de formas tripomastigotas marcadas com Gal-1-FITC (Figura 4). Pode-se observar que a marcação para Gal-1-FITC nas células de *T. cruzi* aumenta com a elevação da concentração dessa lectina e diminui com a presença do carboidrato específico para a Gal-1 (lactose, 20mM). Estes achados mostram que a interação Gal-1/*T.cruzi* é dose-dependente e está associada ao domínio de reconhecimento de carboidratos desta proteína.

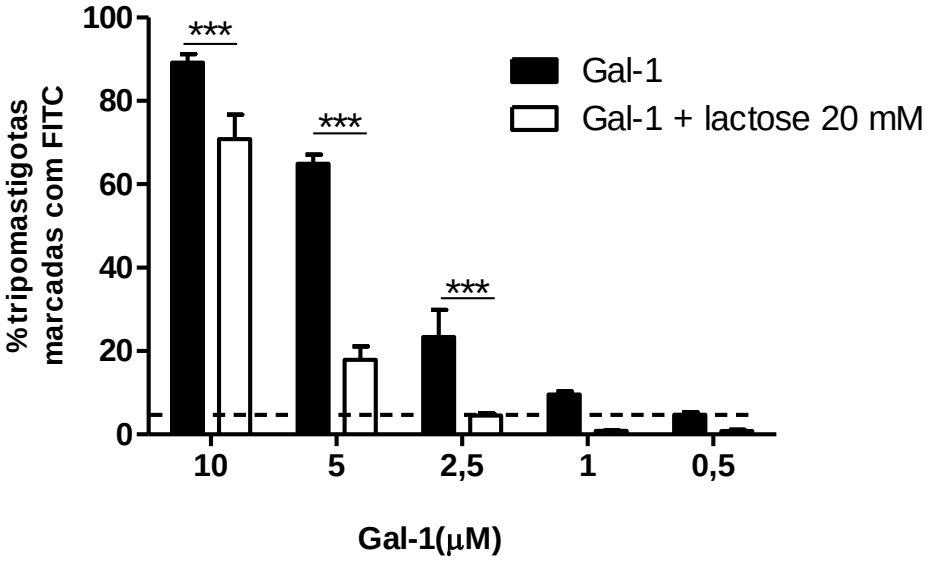


Figura 4 – Galectina-1 se liga de modo carboidrato-dependente à superfície de *Trypanosoma cruzi*. Concentrações crescentes de Gal-1 alquilada e derivatizada com FITC (Gal-1-FITC: 0,5 a 10 µM) foram incubadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas em cultura de células LLCMK2. A análise da interação Gal-1-FITC com células parasitárias foi feita por citometria de fluxo e os resultados foram expressos porcentagem de tripomastigotas marcados com Gal-1-FITC (média +/- desvio padrão). Nota-se um aumento da fluorescência das células de *T. cruzi* com o aumento da concentração de Gal-1-FITC. A lactose (20mM), um carboidrato inibidor da atividade lectínica da Gal-1, foi capaz de reduzir a marcação de formas tripomastigotas com Gal-1-FITC. *** indica $p<0,001$ quando as porcentagens de células marcadas com FITC entre os grupos são comparadas.

4.3 Investigação da taxa de morte de células de *T. cruzi* tratadas com galectina-1

Considerando que a Gal-1 pode reconhecer glicanas na superfície de tripomastigotas (Figura 4), o próximo passo foi avaliar se a interação Gal-1/*T. cruzi* poderia causar a morte deste parasita. Assim, formas tripomastigotas foram tratadas com diferentes concentrações de Gal-1, na presença ou ausência de carboidratos, e submetidas a citometria de fluxo para determinação da taxa de incorporação de iodeto de propídeo. A figura 5 mostra que o tratamento deste parasita com soluções Gal-1 (1-10 µM), adicionadas ou não de α-lactose e sacarose, não causou a morte das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Entretanto, o aquecimento do parasita à 80ºC por 45 minutos conforme procedimento adaptado da literatura (BONNEY *et al.*, 2013) causou uma drástica redução de

sua viabilidade celular (Figura 5). Dessa maneira, sugere-se que a interação de Gal-1 com glicanas da superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* não leva à morte dessas células, na concentração e tempo observados.

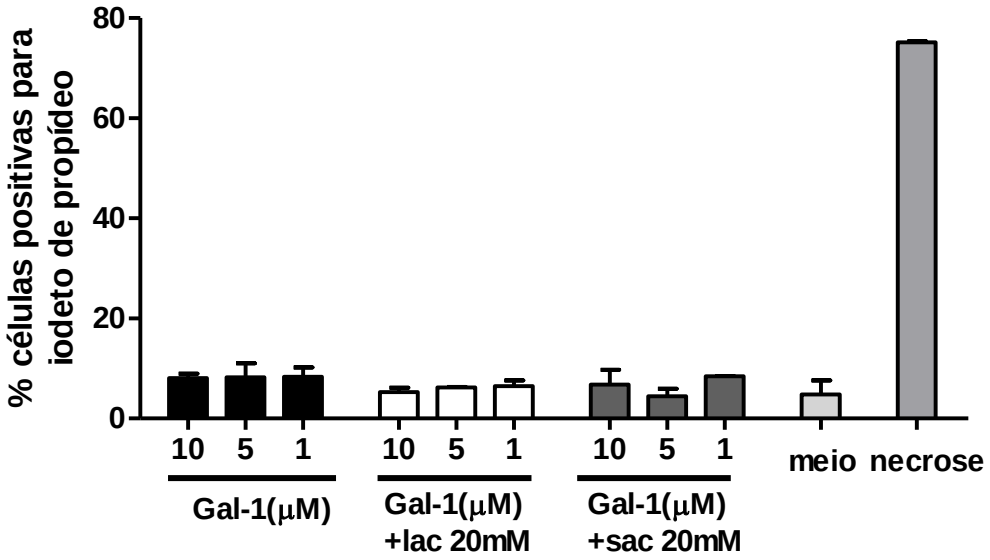


Figura 5 – Galectina-1 não induz necrose nas células de *Trypanosoma cruzi*, na presença ou ausência de carboidratos. Diferentes concentrações de Gal-1 (1 a 10 μM) foram incubadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas em cultura de células LLCMK2, por uma hora à 37ºC. Soluções de Gal-1 contendo α-lactose (lac) ou sacarose (sac) também foram testadas. Como controles negativo e positivo de necrose foram utilizados parasitas incubados apenas com meio de cultura e parasitas aquecidos por 45 minutos à 80ºC (necrose), respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pela determinação da porcentagem de incorporação de iodeto de propídeo, por citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com Gal-1, na presença ou ausência dos carboidratos-controles, indicando que Gal-1 não causa danos às formas tripomastigotas de *T. cruzi* nas concentrações e tempo avaliados. A barra de erros refere-se ao desvio padrão das análises obtidas.

4.4 Avaliação do efeito de galectina-1 e de anticorpos anti-glicopeptídeos sintéticos de mucina de *T. cruzi* na invasão de fibroblastos por este parasita

Sabendo-se que Gal-1 liga-se a glicanas da superfície de *T. cruzi* (Figura 4) e não provoca a morte de formas tripomastigotas desse parasita (Figura 5), a próxima etapa do trabalho consistiu em investigar se a Gal-1 poderia interferir na invasão de *T. cruzi* em células do hospedeiro, como os fibroblastos. Para tanto,

formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram marcadas com CFSE e tratadas Gal-1, e colocados em contato com fibroblastos LLCMK2, na proporção de 5 parasitas para cada fibroblasto, por 2 horas, conforme procedimento adaptado da literatura (APARICIO; SCHARFSTEIN; LIMA, 2004). Paralelamente, células de *T. cruzi* marcadas com CFSE e pré-incubadas com amostras de soro-imune contendo anticorpos anti-glicopeptídeos sintéticos deste parasita também foram utilizadas no ensaio de invasão, segundo referência em anexo (CAMPO *et al.*, 2014). Após esse período de incubação, os poços foram lavados, fixados e analisados pelo aparelho *ImageXpress Micro Widefield High-Content Imaging System (Molecular Devices, EUA)*. Dessa maneira, imagens do interior dos fibroblastos referentes à detecção do parasita, marcado em verde, foram adquiridas e encontram-se ilustradas na Figura 6. A localização intracelular de *T. cruzi* foi feita com o auxílio da marcação das células infectadas com a lectina WGA (marcação da membrana plasmática) e com o DAPI (marcação de núcleo), dados não mostrados. A análise dessas imagens indicou uma diminuição das marcações em verde no interior das células tratadas com Gal-1, quando comparadas com o controle (Figura 6C). A quantificação das marcações em verde referentes aos parasitas também foi feita pelo sistema utilizado, e o gráfico correspondente encontra-se na figura 6F. Novamente, notamos a diminuição da quantidade de parasitas marcados com CFSE no interior dos fibroblastos após o tratamento com Gal-1. Esses dados, em associação os achados ilustrados nas figuras 4 e 5, mostram que a interação da Gal-1 com a superfície do parasita ocorre de maneira dependente de carboidrato e não provoca a morte do parasita, mas pode impedir sua invasão nas células do hospedeiro (Figura 6). Além disso, assim como ocorre para a Gal-1, o reconhecimento de glicanas parasitárias por anticorpos anti-glicopeptídeos (1 e 2) sintéticos de mucina provocou uma drástica inibição da invasão de *T. cruzi* em fibroblastos (Figura 6D e Figura 6E). Salienta-se que estes glicopeptídeos sintéticos foram construídos com base na estrutura de mucinas de *T. cruzi* e contem β-galactosídeos que são ligantes potenciais para galectinas, incluído a Gal-1. Assim, futuros estudos serão feitos para investigar o padrão de interação de Gal-1 com estes glicopeptídeos miméticos de mucinas de *T. cruzi* e o envolvimento desta interação na regulação da invasão deste parasita em células do hospedeiro mediada por Gal-1.

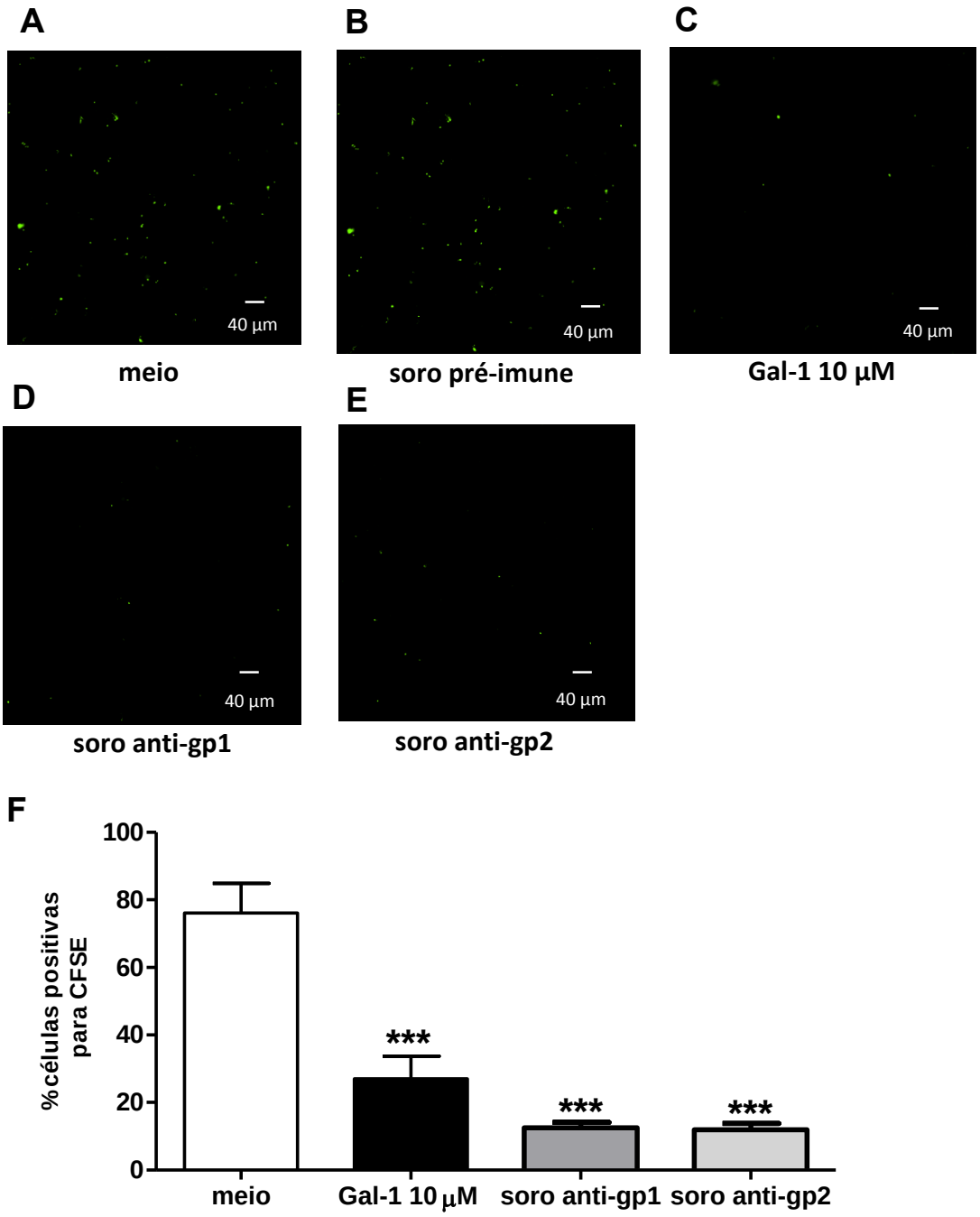


Figura 6 – Tratamento com galectina-1 ou com soro anti-glicopeptídeos sintéticos de mucina de *T. cruzi* diminui a invasão de formas tripomastigotas deste parasita em fibroblastos. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram marcadas com CFSE e incubadas com 10 µM de Gal-1 alquilada. Em seguida, os parasitas foram lavados e usados no ensaio de invasão de fibroblastos LLCMK2. Após duas horas de infecção, os poços foram lavados, foi feita fixação do material, que foi analisado pela técnica de *High Content Screening*. A) Tripomastigotas incubadas apenas com meio de cultura; B) com soro pré-imune; C com galectina-1 10 µM; D) com soro anti-glicopeptídeo 1 e E) com soro anti-glicopeptídeo 2. Todos os soros utilizados foram diluídos 1:50 em PBS. Nota-se que o tratamento com Gal-1 diminuiu a invasão dos fibroblastos pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi* no tempo de infecção avaliado. A barra de erros refere-se ao desvio padrão das médias das marcações relativas aos parasitas por campo analisado. *** indica $p<0,001$.

4.5 Avaliação do efeito da galectina-1 na captura de *T. cruzi* por macrófagos peritoneais

Tendo avaliado a ligação de Gal-1 à superfície de *T. cruzi*, e o seu efeito em inibir a entrada de parasitas em fibroblastos (modelo de invasão *in vitro*), o próximo passo de nosso estudo foi avaliar se o tratamento com Gal-1 teria efeito na captura do parasita por macrófagos, uma célula da imunidade inata importante no controle de sua replicação (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994, SILVA *et al.*, 1995, SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003). Dessa forma, as formas tripomastigotas foram pré-tratadas com Gal-1 10 µM (ou PBS somente, como controle) por uma hora, lavadas, e colocadas em contato com os macrófagos peritoneais por duas horas de infecção. Em seguida, o material foi lavado, fixado e corado para avaliação, por microscopia óptica, da porcentagem de macrófagos infectados, na presença e na ausência de Gal-1, e os resultados encontram-se ilustrados na figura 7.

O tratamento com Gal-1 resultou numa porcentagem menor de macrófagos infectados por *T. cruzi*, do que aqueles que foram incubados com o mesmo volume de PBS (Figura 7). No entanto, será necessário aprofundar os estudos da interação de Gal-1, *T. cruzi* e macrófagos para entender melhor qual o mecanismo pelo qual esta lectina atua de forma a reduzir o número de macrófagos infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi.*

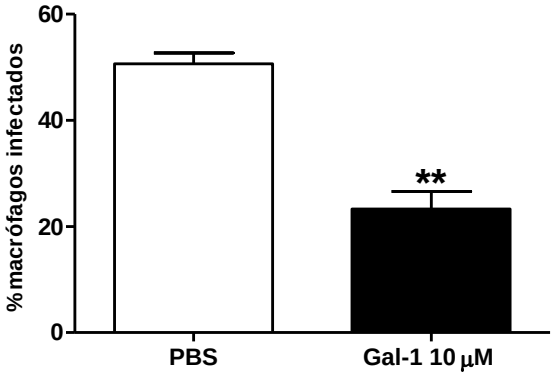


Figura 7 – Tratamento com galectina-1 diminui a captura de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por macrófagos. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubadas com 10 µM de Gal-1. Em seguida, os parasitas foram lavados e usados para a infecção de macrófagos peritoneais obtidos por elicitação com tioglicolato, sobre lamínula de vidro. Após duas horas de infecção, os poços foram lavados, foi feita fixação e coloração do material, que foi avaliado por microscopia óptica. Nota-se que o tratamento com Gal-1 diminuiu a captura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* pelos macrófagos nos dois tempos de infecção avaliados. A barra de erros refere-se ao desvio padrão das médias de macrófagos infectados obtidas. ** indica $p<0,01$.

4.6 Efeito do tratamento com galectina-1 na capacidade tripanocida de macrófagos peritoneais

Num próximo passo do trabalho e na tentativa de entender melhor a participação de Gal-1 no contexto da infecção de macrófagos por *T. cruzi*, formas tripomastigotas foram colocadas em contato com macrófagos peritoneais por uma hora para sua infecção. Depois disso, os poços foram lavados, completados com meio de cultura com Gal-1 (10 µM) ou PBS (controle) e incubados em condições apropriadas. Após 2, 3, 4 e 5 dias de incubação, o meio dos poços foi coletado, centrifugado, o sobrenadante armazenado para dosagem de nitritos (Figura 8B), os tripomastigotas liberados pelos macrófagos foram contados em azul de tripan com formaldeído 1% (Figura 8A).

Como ilustrado na Figura 8A, o tratamento com Gal-1 inibiu a liberação de tripomastigotas para o meio no quarto e quinto dia pós-infecção em relação ao controle (PBS). Ainda, comparando-se os resultados da Figura 8A com as dosagens de nitritos na Figura 8B, é possível relacionar essa menor liberação de

tripomastigotas com uma maior produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratados com Gal-1.

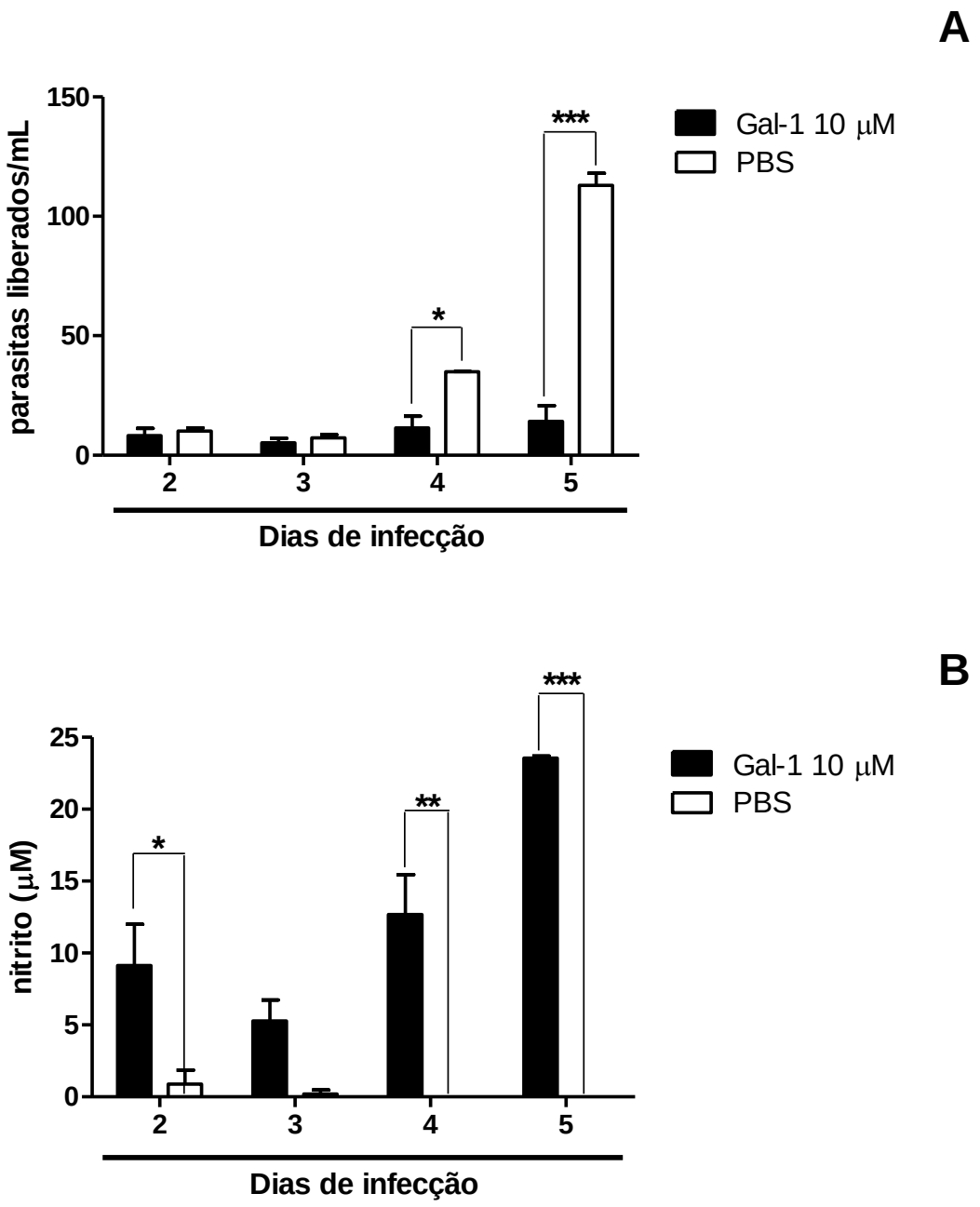


Figura 8 – Tratamento com galectina-1 diminui a liberação de formas tripomastigotas por macrófagos infectados com *T. cruzi* e aumenta a produção de óxido nítrico nessas células. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubadas com 10 µM de Gal-1, lavadas e usadas para a infecção de macrófagos peritoneais. Coletou-se o sobrenadante das culturas após 2, 3, 4 e 5 dias de infecção, para contagem das formas tripomastigotas liberadas (A) e dosagem de nitritos (B). Nota-se que o tratamento dos macrófagos infectados com Gal-1 diminuiu a liberação das formas tripomastigotas de *T. cruzi* e aumentou o acúmulo de nitritos, indicando uma maior produção de óxido nítrico nas células tratadas. A barra de erros refere-se ao desvio padrão das médias de tripomastigotas liberadas e das concentrações de nitritos nas análises obtidas. * indica $p<0,05$, ** indica $p<0,01$ e *** indica $p<0,001$.

4.7 Avaliação da capacidade de galectina-1 induzir a produção de óxido nítrico em macrófagos deficientes ou não de TLR4

Após verificar o acúmulo de nitritos nas culturas de macrófagos peritoneais infectados com *T. cruzi* e tratados com Gal-1 (Figura 8), o próximo passo foi investigar se essa produção de óxido nítrico estaria relacionada com a possível presença de LPS proveniente do processo de produção da lectina recombinante. Lipopolissacarídeos provenientes da parede celular de bactérias Gram-negativas ligam-se a TLR4, levando à sua ativação e consequente produção de óxido nítrico (AKIRA; TAKEDA, 2004, LU; YEH; OHASHI, 2008). Assim, macrófagos peritoneais elicitados por tioglicolato obtidos de camundongos C57BL/6 selvagens e/ou *tlr4*$^{-/-}$ (TLR4 KO) foram tratados com diferentes concentrações de Gal-1, produzida e purificada conforme descrito anteriormente, na presença ou ausência de IFN-γ. Curvas-padrão de resposta ao estímulo por LPS foram construídas a partir de macrófagos obtidos de ambas linhagens de camundongos com concentrações crescentes de LPS ultra-puro, também na presença de IFN-γ. Após 48 horas de incubação das células, o sobrenadante das culturas foi coletado, e fez-se a determinação de nitritos pelo método de Griess, e os resultados encontram-se na Figura 9. Houve uma produção detectável e dose-dependente de nitritos nas culturas de macrófagos obtidos de animais selvagens estimuladas com LPS (Figura 9A), o que não ocorreu nas células destituídas do gene *tlr4* (Figura 9B), indicando a eficiência do método para detecção de LPS. Nota-se ainda que, na ausência de IFN-γ, a Gal-1 mesmo na maior concentração (10 µM) não induziu a produção de óxido nítrico, em nenhuma das culturas de macrófagos avaliadas. No entanto, quando adiciona-se IFN-γ em conjunto com a Gal-1, detectou-se um aumento da produção de óxido nítrico com concentrações crescentes de Gal-1 (Figura 9C). Tal fenômeno pode ser observado tanto nas culturas de macrófagos provenientes de camundongos selvagens, como daquelas provenientes de camundongos destituídos do gene para TLR4. Dessa maneira, pode-se sugerir que Gal-1, sinergicamente com IFN-γ, induz a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de maneira independente de TLR4. Ainda, este conjunto de resultados sugere que as preparações purificadas de Gal-1 e submetidas ao

tratamento com agarose-polimixina-B não apresentam níveis de LPS detectável por este ensaio biológico.

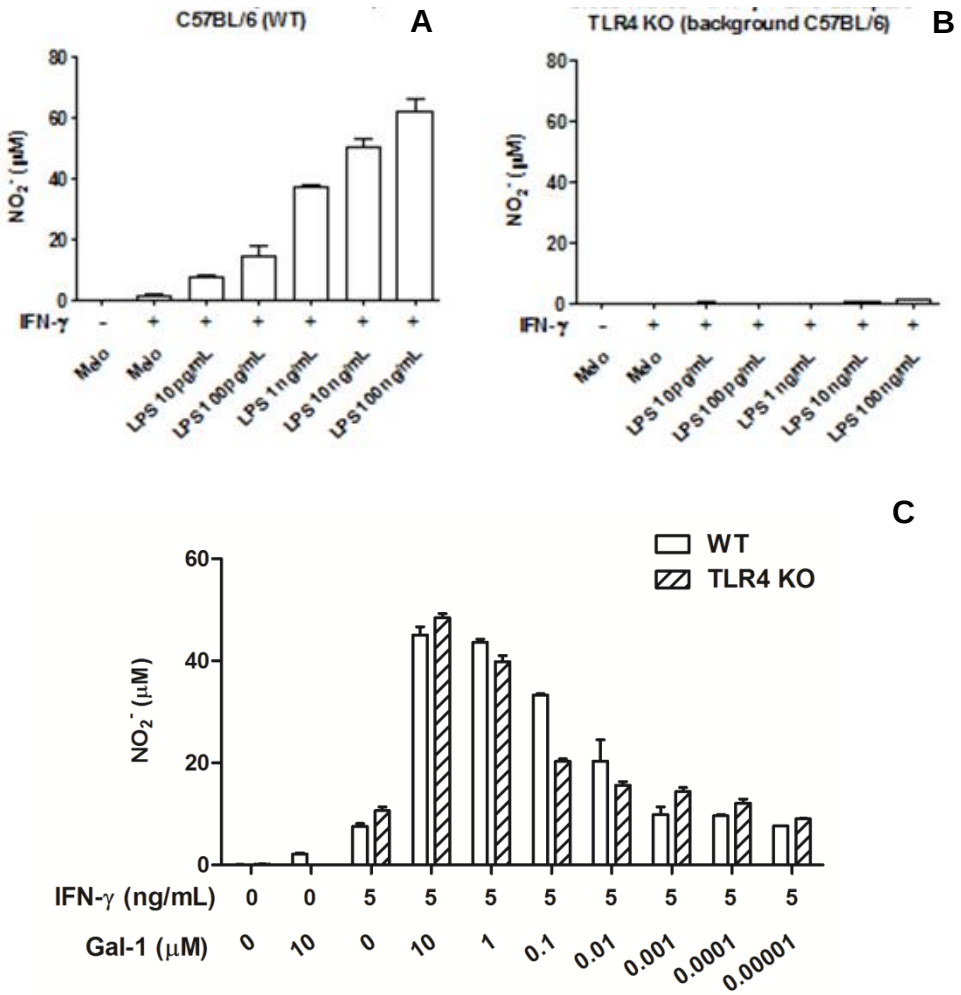


Figura 9 – Tratamento com galectina-1 aumenta a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com IFN-γ de maneira independente de TLR4. Macrófagos peritoneais obtidos por elicitação com tioglicolato de camundongos WT (C57BL/6) e TLR4 KO foram tratados com diferentes concentrações de Gal-1 ou LPS ultra-puro, na presença de IFN-γ, por 48 horas. Após o tratamento, dosou-se a concentração de nitrito nos sobrenadantes pelo método de Griess. (A) Macrófagos WT estimulados com LPS. (B) Macrófagos TLR4 KO estimulados com LPS. (C) Macrófagos WT e TLR4 KO tratados com Gal-1. Nota-se que o tratamento dos macrófagos com Gal-1 aumentou a produção de óxido nítrico nas células tratadas na presença de IFN-γ tanto em células provenientes de camundongos WT como daqueles destituídos do gene para TLR-4. A barra de erros refere-se ao desvio padrão da média das concentrações de nitritos obtidas.

4.8 Tratamento de camundongos infectados por *T. cruzi* com galectina-1 e determinação da parasitemia na fase aguda

Ainda buscando avaliar o efeito da presença de Gal-1 recombinante na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, camundongos C57BL/6 selvagens, ou destituídos do gene para TLR4 (TLR4 KO) foram infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e tratados com Gal-1 recombinante produzida e purificada durante o curso da fase aguda da infecção. O número de parasita no sangue dos animais foi avaliado em diversos dias após a infecção, e os resultados encontram-se na Figura 10. Grupos de camundongos controle de ambos os genótipos foram infectados e tratados apenas com o veículo de diluição da Gal-1, tampão fosfato (PBS), e também tiveram sua parasitemia avaliada. Pode-se notar que tanto os camundongos selvagens (Figura 10A) quanto aqueles destituídos do gene para TLR-4 (TLR4 KO) (Figura 10B) apresentaram redução significativa do número de parasitas circulantes no pico da parasitemia em relação aos controles tratados apenas com PBS (Figura 10). Além disso, na ausência do tratamento de Gal-1, os animais TLR4 KO apresentaram maior parasitemia dos que os selvagens, pois TLR-4 é um receptor importante na montagem da resposta imunológica inata a *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

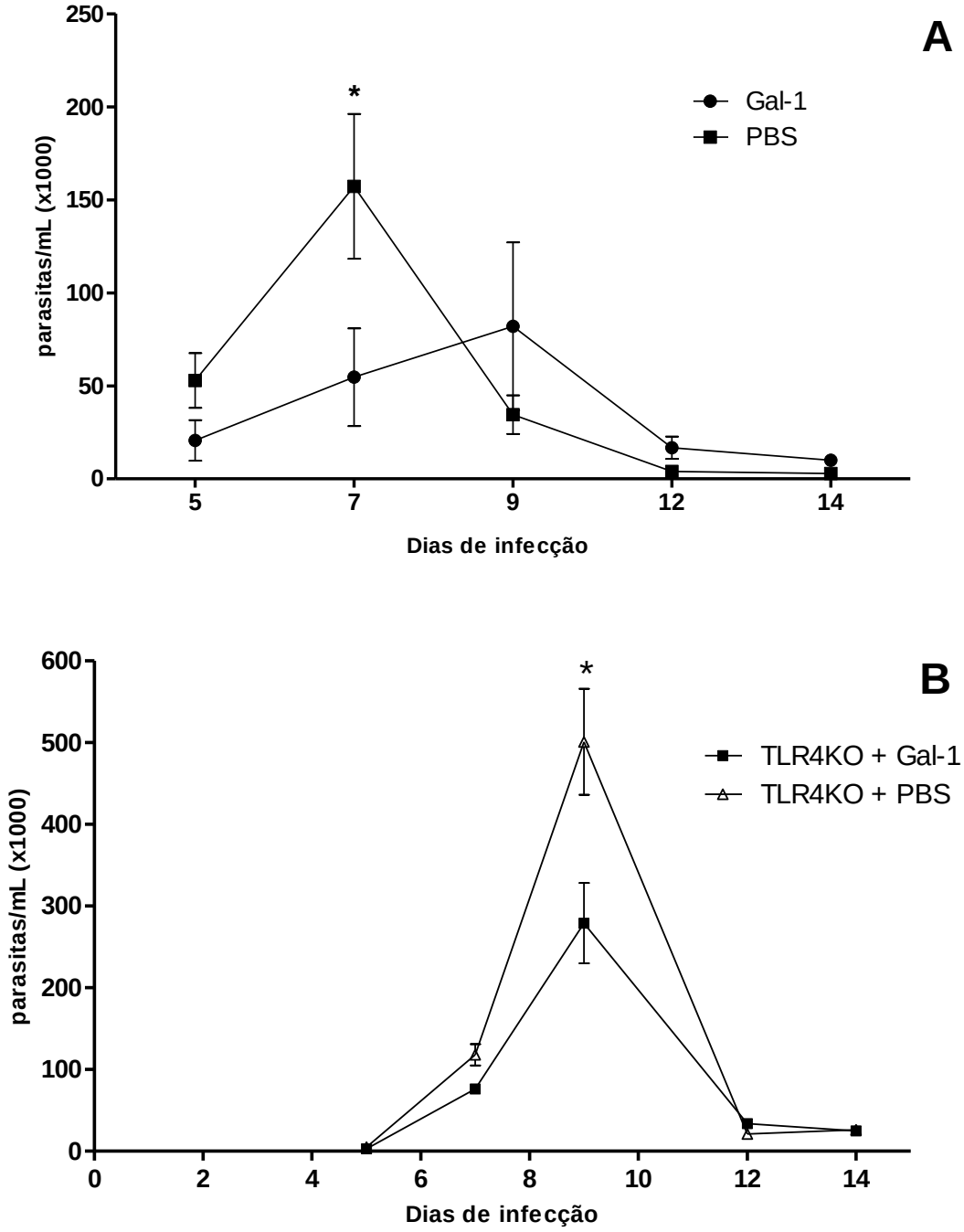


Figura 10 – Tratamento com galectina-1 diminui a parasitemia de camundongos WT infectados com *T. cruzi* de maneira independente de TLR4. Solução de Gal-1 foi utilizada (10 µg por cada injeção peritoneal) no tratamento de camundongos WT (A) e TLR-4 KO (B) do 5º ao 10º dia da infecção por *T. cruzi*. A parasitemia dos animais foi determinada durante o mesmo período, e foi possível observar uma redução na contagem de parasitas do sangue dos camundongos tratados com Gal-1, em relação àqueles tratados apenas com o veículo, PBS. A barra de erros refere-se ao desvio padrão da média das parasitemias obtidas em cada dia analisado. * indica $p<0,05$ quando os grupos são comparados no mesmo dia de infecção.

4.9 A presença de Gal-1 endógena afeta o número de parasitas circulantes e a taxa de mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi*

Para avaliação da participação da Gal-1 endógena na evolução da fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, camundongos C57BL/6 destituídos (KO Gal-1) ou não (WT) do gene da galectina-1 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas cada, suspensos em 200 µL de PBS, por via intraperitoneal. O número de parasitas circulantes foi analisado segundo o método descrito na literatura (MELO; BRENER, 1978), e a evolução da parasitemia nos dois grupos encontra-se na Figura 11. Pode-se notar que os animais selvagens (WT, *wild type*) apresentam uma parasitemia 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 avaliados, essa diferença não foi observada.

A sobrevivência dos camundongos WT e KO Gal-1 após infecção experimental por *T. cruzi,* com 10.000 formas tripomastigotas cada, também foi avaliada, e a taxa de mortalidade encontra-se na Figura 11. É possível observar que, até 15 dias após a infecção, 100% dos camundongos WT sucumbiram à infecção, enquanto mais de 90% dos animais KO Gal-1 permaneceram vivos até o 50º dia de infecção. A escolha da carga de 10.000 formas para infecção nos experimentos de sobrevivência foi feita após observação de que a infecção dos animais com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* não ocasionava a diferença significativa nas taxas de mortalidade dos dois grupos (dados não mostrados).

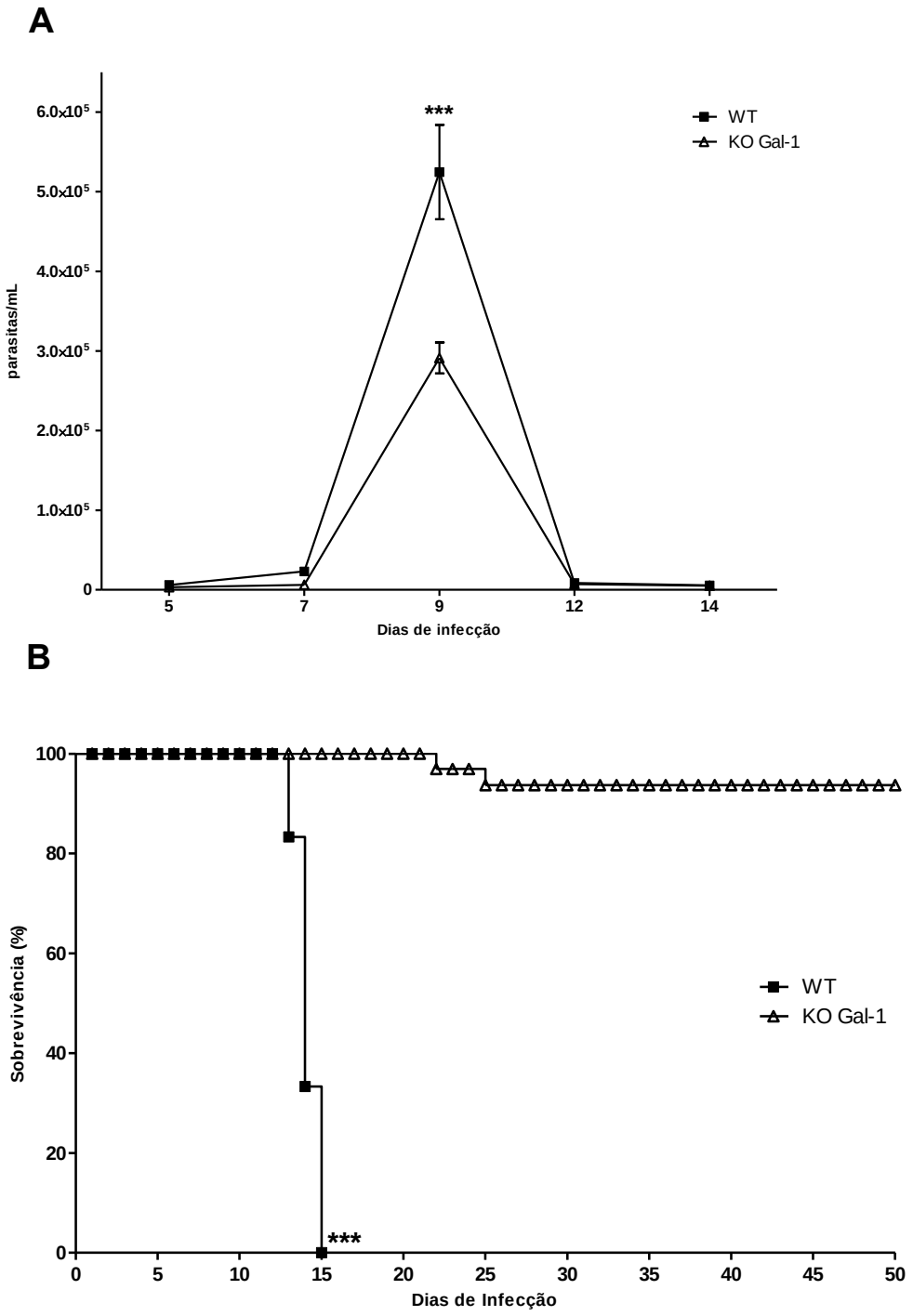


Figura 11 - Parasitemia e taxa de mortalidade dos camundongos C57BL6 WT e KO Gal-1 infectados experimentalmente com a cepa Y de *T. cruzi*. A) níveis de parasitemia nos camundongos infectados com 1000 formas tripomastigotas, após análise dos parasitas presentes em 5 µL do sangue coletado da cauda, n = 5 camundongos por grupo. B) Porcentagens de camundongos que sucumbiram à infecção por 10.000 formas tripomastigotas, n = 6 animais por grupo. *** indica significância estatística (p<0,001) entre o grupo WT e KO Gal-1.

4.10 Modulação do perfil de células recrutadas para o peritônio e na circulação sanguínea de camundongos infectados com *T. cruzi* causada pela ausência de Gal-1 endógena

Visando avaliar se o controle da infecção por *T. cruzi* se inicia já no peritônio dos camundongos, região onde são inoculadas as formas tripomastigotas, a população celular do peritônio de camundongos C57BL/6 WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* foi avaliada, após 1, 2 e 3 dias de infecção, conforme resultados ilustrados na Figura 12. É possível notar que, com 24 horas após a infecção, a população predominante de células no peritônio de animais WT é de macrófagos, enquanto que no peritônio de animais KO Gal-1 a porcentagem de neutrófilos é drasticamente superior àquela dos animais WT. Após 48 horas de infecção, no entanto, essa diferença entre as populações deixa de existir.

Uma estimativa da condição do estado de um animal infectado pode ser feita pela avaliação do perfil das células imunológicas circulantes no sangue periférico desses indivíduos. Para tanto, o sangue de camundongos C57BL/6 WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* foi coletado para confecção de um esfregaço sanguíneo nos dias 5, 7, 9, 12 e 14 pós-infecção, que posteriormente foi fixado e corado para a contagem diferencial das células circulantes nesses camundongos, e os resultados das porcentagens de neutrófilos, monócitos e linfócitos encontram-se na Figura 13.

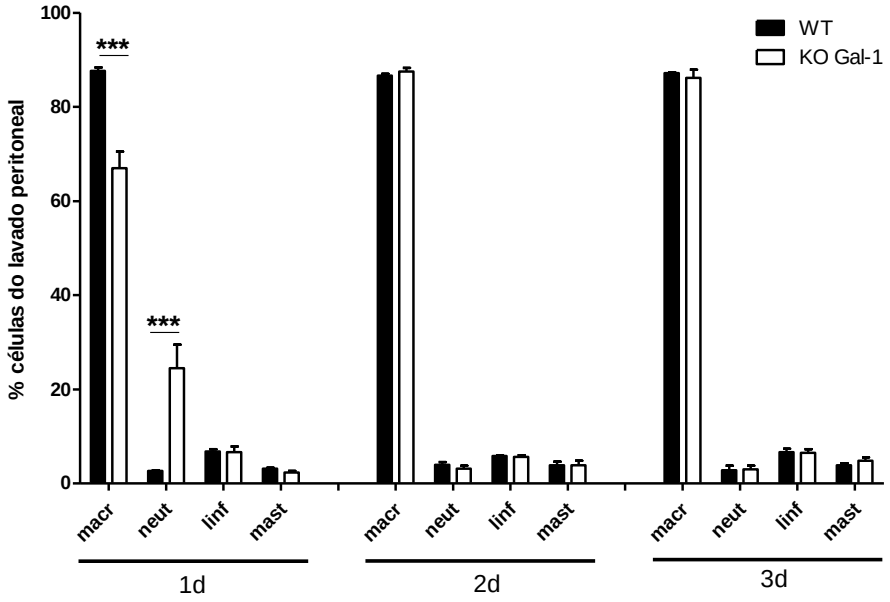


Figura 12 - Perfil de células infiltradas no peritônio de camundongos WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*. Foram analisados, por meio de contagem diferencial, os seguintes tipos celulares: macrófagos (macr), neutrófilos (neut), linfócitos (linf) e mastócitos (mast). As análises foram realizadas em diferentes dias (1d, 2d e 3d) após a infecção intraperitoneal dos animais com 10^3 tripomastigotas de *T. cruzi*. *** indica significância estatística ($p<0,001$) quando a média das populações celulares é comparada entre os dois grupos no mesmo período de tempo.

É interessante notar que os animais KO Gal-1 apresentam maior quantidade de neutrófilos circulantes logo no quinto dia de infecção, quando comparados com o grupo WT (Figura 13A). Ao longo do curso da infecção, no entanto, ambos os grupos apresentam, de modo similar, uma redução no número de neutrófilos circulantes.

Já em relação aos monócitos, pode-se observar que os animais WT mostram uma tendência de elevação da porcentagem de monócitos circulantes em todos os pontos observados, sendo esse aumento significativo nos dias 5 e 12 após a infecção, quando comparados aos animais KO Gal-1 (Figura 13B). Por fim, a porcentagem de linfócitos também foi determinada (Figura 13C). Nos primeiros dias de infecção as porcentagens destas células circulantes foram similares para os dois grupos de animais. Entretanto, foi detectado um aumento pronunciado de linfócitos nos animais KO Gal-1 no 12º dia de infecção.

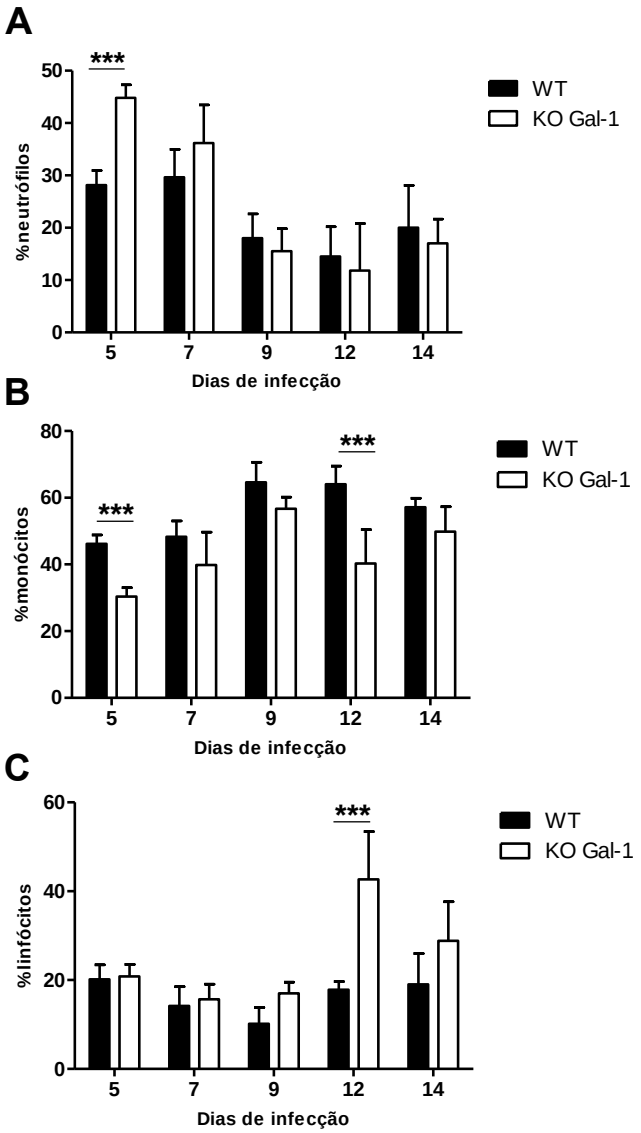


Figura 13 - Avaliação de células imunológicas circulantes no sangue de animais WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*. Sangue periférico de camundongos infectados com *T. cruzi* foi coletado em diferentes dias, e a contagem diferencias de leucócitos circulantes foi feita em esfregaço sanguíneo corado. A) Neutrófilos; B) monócitos e C) linfócitos. A caracterização das células se baseou nas suas características morfológicas. *** indica significância estatística ($p<0,001$) quando a média das populações celulares é comparada entre os dois grupos no mesmo período de tempo.

4.11 Análise do tecido cardíaco de animais infectados (WT e KO Gal-1) quanto a presença de infiltrado inflamatório, integridade das fibras musculares e detecção de parasitas

Para se avaliar o impacto da ausência da Gal-1 endógena sobre o dano tissular provocado no coração de animais infectados por *T. cruzi* realizamos uma análise histopatológica do tecido de cardíaco de camundongos C57BL/6 (WT ou KO Gal-1) infectados por 7, 14 e 21 dias (Figura 14). Notamos que, a integridade das fibras cardíacas de ambos animais permanece praticamente inalterada após 7 dias de infecção, quando os parasitas encontram-se ainda livres na circulação sanguínea (Figura 11). Já com 14 dias após a infecção notamos um aumento nos focos de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco dos animais, sendo que nos camundongos WT esses focos aparentam ser maiores e mais frequentes. Além disso, aparentemente, ocorreu um acúmulo de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de camundongos WT, diferentemente do observado em animais KO Gal-1 (Figura 14, 14d). A detecção de amastigotas isolados no tecido cardíaco dos animais-testes ainda será realizada por meio de uma análise imunoquímica no tecido cardíacos destes animais.

A diferença entre os grupos se faz ainda mais clara com 21 dias após a infecção com *T. cruzi*, em que os animais WT ainda apresentam infiltrado inflamatório proeminente no tecido cardíaco, enquanto que o aspecto histológico do tecido cardíaco dos animais KO Gal-1 já se assemelha às imagens correspondentes ao tecido dos animais não-infectados (Figura 14, 21d). As imagens obtidas, no entanto, não diferenciam os tipos celulares presentes. Para tanto, outros procedimentos foram utilizados, como imunofenotipagem por citometria de fluxo, e dosagem das atividades de mieloperoxidase e N-acetyl-β-D-glucosaminidase, que serão apresentados adiante. Além disso, a maior carga parasitária encontrada no coração de animais WT em relação aos camundongos KO Gal-1 foi confirmada por PCR em tempo real, como ilustrado na Figura 20.

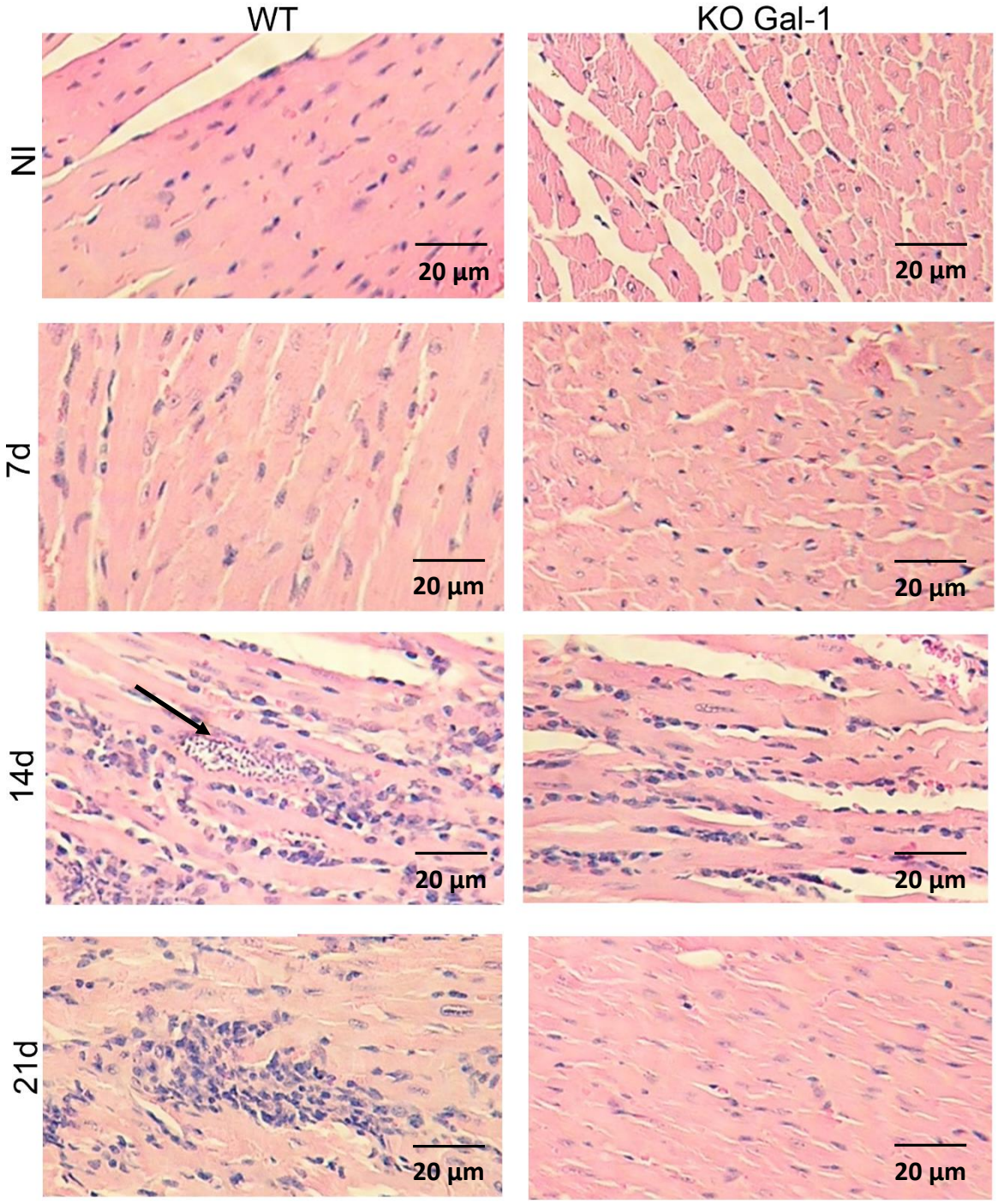


Figura 14 - Perfil histopatológico do tecido cardíaco de camundongos WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*. As imagens correspondem a seções representativas de tecidos cardíacos coletados, processados e analisados de 3 animais por grupo, por tempo experimental. NI: não infectado; 7d, 14d e 21d: 7, 14 e 21 dias após a infecção, respectivamente. A seta indicada a presença de ninhos de amastigotas.

4.12 Dosagem da atividade das enzimas MPO e NAG em tecido cardíaco de camundongos deficientes ou não para o gene da Gal-1 e infectados com *T. cruzi*

Uma metodologia simples e rápida para a estimativa da população de alguns tipos celulares infiltrados em tecidos é a dosagem de enzimas específicas produzidas por essas células. Para tanto, foi realizado um ensaio de atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG), predominantes em neutrófilos e macrófagos respectivamente, no extrato de tecido cardíaco de camundongos WT ou KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14 dias (período de maior incidência de infiltrado leucocitário no coração dos animais), e os resultados encontram-se ilustrados na Figura 15.

É interessante notar que no extrato cardíaco dos camundongos KO Gal-1 há uma maior atividade de mieloperoxidase, em relação ao extrato dos animais

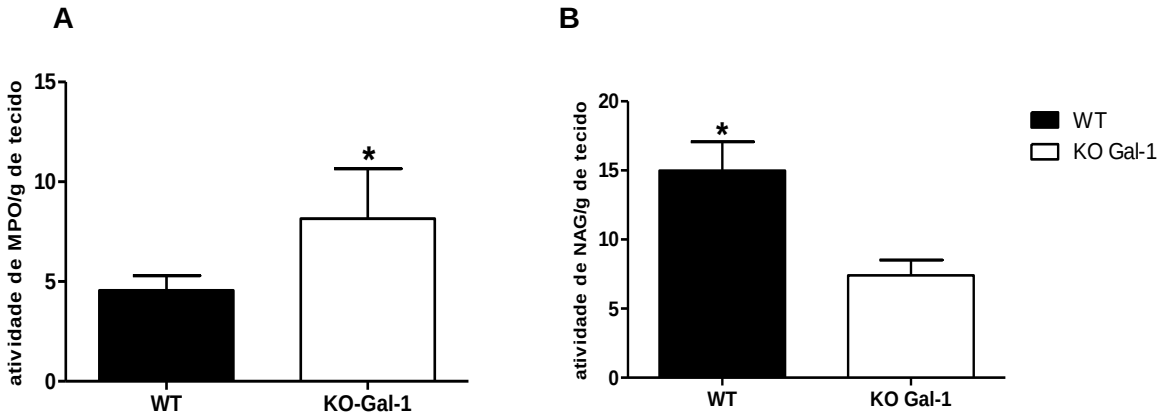


Figura 15 - Dosagem de mieloperoxidase (MPO) e N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) no extrato de tecido cardíaco de camundongos infectados com *T. cruzi*. O extrato cardíaco de camundongos WT e KO Gal-1 infectados por 14 dias com T. cruzi foi submetido a dosagem de mieloperoxidase (MPO) (A) e N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) (B).* indica $p<0,05$ quando as médias de ambos os grupos foram comparadas.

WT, o que indica uma predominância na população de neutrófilos no coração desses animais (Figura 15A). Já a enzima N-acetyl-β-D-glucosaminidase apresentou maior atividade no tecido cardíaco de animais WT em relação aos animais KO Gal-1, indicando maior quantidade de população de macrófagos no coração dos animais WT (Figura 15B). Esse resultado reforça outros dados aqui já relatados, como a predominância de neutrófilos na circulação sanguínea (Figura 13) e no peritônio dos camundongos KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*, bem como a maior população de monócitos no sangue e de macrófagos no peritônio de animais WT igualmente infectados (Figura 12). No entanto, a população de diferentes linfócitos no coração dos animais infectados, importantes na produção de citocinas e no controle da infecção por *T. cruzi* também foi avaliada.

4.13 Imunofenotipagem de linfócitos infiltrados no tecido cardíaco de animais WT ou KO Gal-1 infectados, por citometria de fluxo

Para a caracterização do perfil de linfócitos infiltrados no tecido cardíaco de camundongos WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi*, os corações desses animais, após 14 e 21 dias de infecção, foram processados de modo a se obter uma suspensão celular a partir da qual pudesse ser executada a imunofenotipagem de leucócitos infiltrados nesse órgão. Após seu isolamento, por velocidade de sedimentação em solução de *Ficol-Hypaque*, esses leucócitos foram marcados com diferentes anticorpos conjugados a fluoróforos, e então analisados por citometria de fluxo, e os resultados encontram-se ilustrados nas figuras 16 e 15.

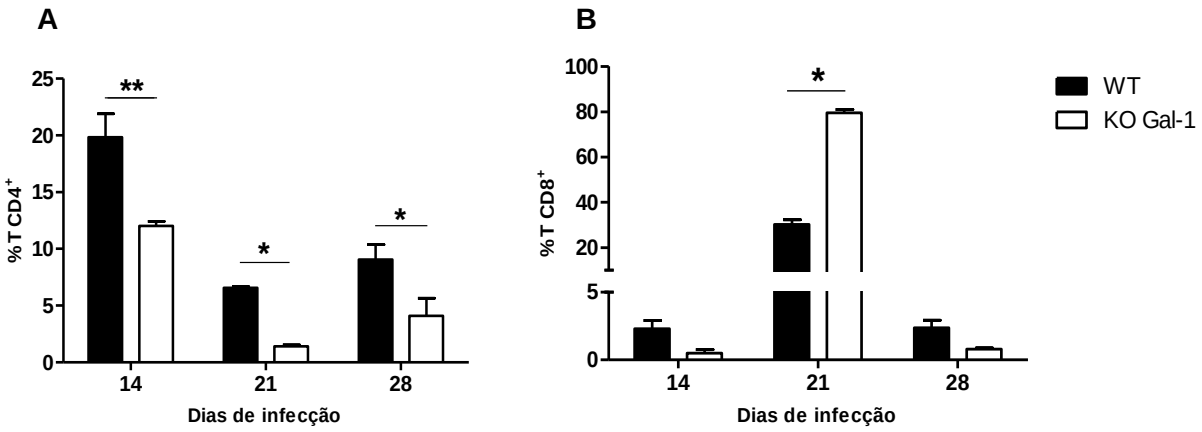


Figura 16 - Perfil de leucócitos infiltrados no tecido cardíaco de animais infectados por *T. cruzi* obtido por citometria de fluxo. O tecido cardíaco de camundongos infectados com *T. cruzi* foi coletado e os leucócitos totais extraídos, marcados com anticorpos específicos e analisados por citometria de fluxo. A) Linfócitos T $CD4^+$ e B) linfócitos T $CD8^+$. ** e * indicam $p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente, quando comparados os grupos WT e KO Gal-1 no mesmo período de infecção.

De acordo com o perfil obtido para os linfócitos T $CD4^+$ (Figura 16A), é possível observar que em todos os períodos de infecção analisados, os animais WT apresentaram maior porcentagem dessas células no infiltrado cardíaco, quando comparados aos animais KO Gal-1 nos mesmos intervalos. Já para o perfil dos linfócitos T $CD8^+$ (Figura 16B), apenas no período de 21 dias de infecção é possível observar diferença nessa população celular entre os grupos, sendo que os animais KO Gal-1 apresentaram maior porcentagem de células T $CD8^+$ em relação aos animais WT. Nos demais dias analisados, os animais de ambos os grupos não apresentaram diferenças quanto a porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ infiltrados no coração. É importante lembrar que os linfócitos T $CD4^+$ constituem uma população de células auxiliares, produtoras de citocinas que pode sinalizar para outras células imunológicas sobre a necessidade no controle de agentes infecciosos (HOFT *et al.*, 2000, SANOJA *et al.*, 2013). Já parte da população de células T $CD8^+$ engloba as células T citotóxicas, que podem eliminar e controlar células infectadas com diferentes agentes intracelulares, com o *T. cruzi*, em modelos de infecção experimental e em humanos (VILLARINO; SCHMIDT, 2013, VASCONCELOS *et al.*, 2014). Já a Figura 17 ilustra a porcentagem de células T regulatórias no infiltrado cardíaco

de camundongos WT e KO Gal-1 em diferentes períodos de infecção. Podemos notar que os animais KO Gal-1 apresentam discreto aumento dessa população de leucócitos no coração após 21 e 28 dias de infecção, apesar dessa diferença não ter significância estatística (p>0,05). As células T regulatórias apresentam importante papel no controle da atividade e população de células pró-inflamatórias e de células NK e T citotóxicas, além de produzir citocinas anti-inflamatórias.

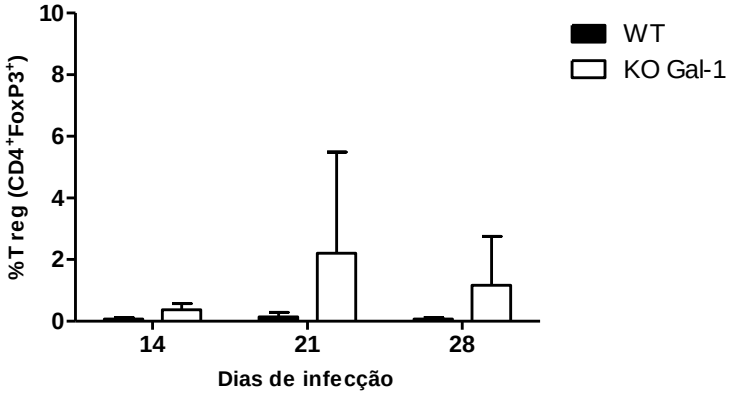


Figura 17 - Perfil de células T regulatórias no infiltrado celular cardíaco de animais infectados por *T. cruzi*. O tecido cardíaco de camundongos infectados com *T. cruzi* foi coletado e os leucócitos totais extraídos, marcados com anticorpos específicos para células T regulatórias e analisados por citometria de fluxo Os animais KO Gal-1 apresentaram discreto aumento no número de células regulatórias no coração em 21 e 28 dias de infecção (p>0,05).

4.14 Dosagens de citocinas no soro e em amostras do extrato do tecido cardíaco de animais infectados

A produção de determinadas citocinas, bem como o controle temporal, local e quantitativo de sua produção no decorrer de um quadro infeccioso é fundamental no controle da replicação do agente infectante e da extensão do dano tecidual causado no hospedeiro. Por isso, a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ, TNF, IL-17A e IL-10, produzidas durante a infecção por *T. cruzi* no soro e no extrato cardíaco de camundongos WT e KO Gal-1, foi realizada após 14 e 21 dias de infecção, e os resultados encontram-se na Figura 18.

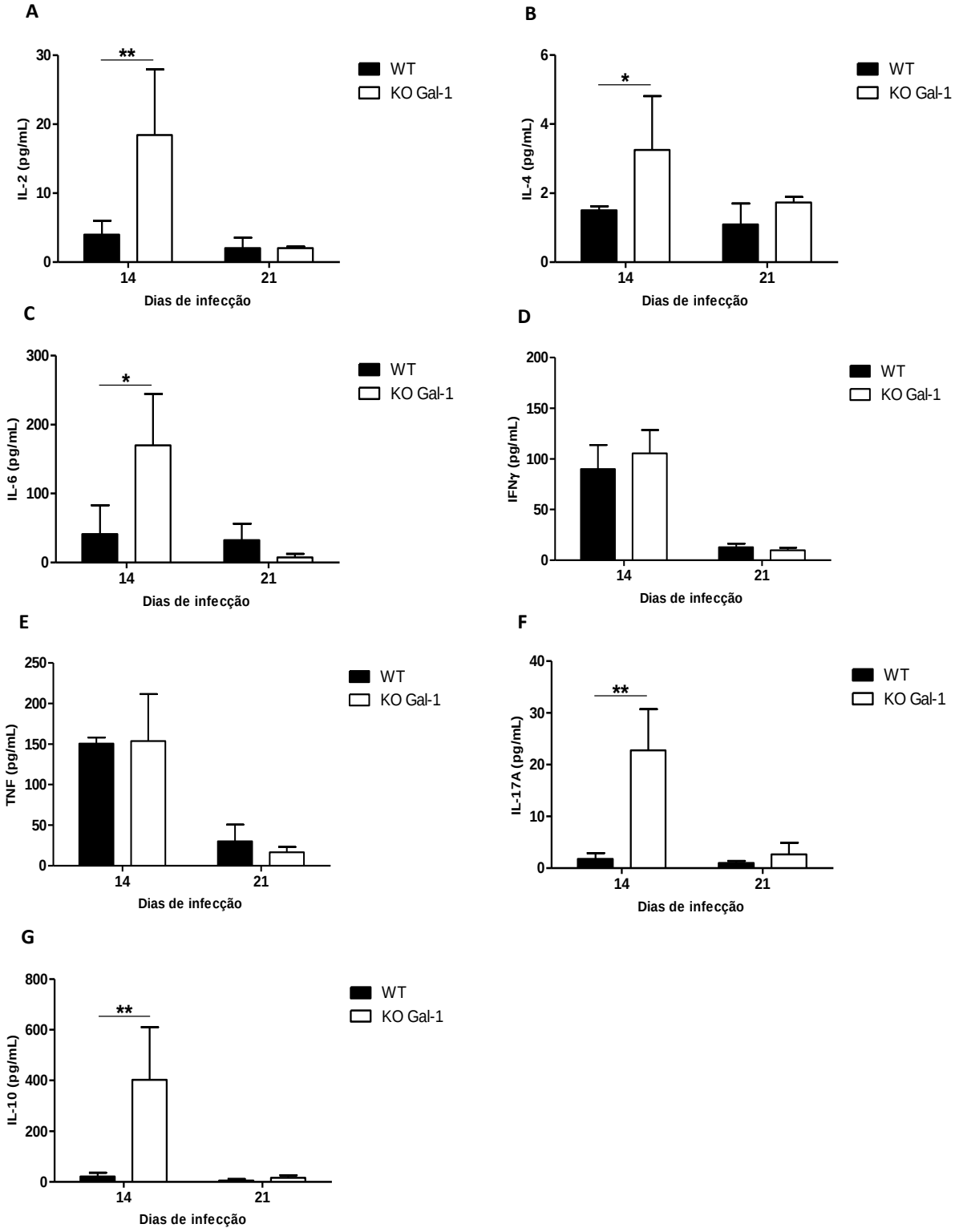


Figura 18 – Concentração de diferentes citocinas no soro de animais WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14 e 21 dias. Os soros dos animais infectados foram obtidos após eutanásia, e as amostras séricas foram analisadas quanto à concentração de citocinas, por citometria de fluxo, com o uso do sistema CBA. *, ** e *** indicam p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente.

Pode-se observar que a maioria das citocinas encontra-se em níveis mais elevados no soro dos animais KO Gal-1 no 14º dia após a infecção, quando comparados aos animais WT no mesmo período de infecção. A exceção a esse aumento fica por conta das citocinas IFNγ e TNF, cujos níveis encontram-se parecidos em ambos os grupos (Figura 18, D e E). Após 21 dias de infecção, no entanto, os dois grupos de animais apresentam níveis semelhantes e reduzidos de todas as citocinas analisadas.

A concentração de citocinas no extrato de tecido cardíaco dos animais WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* também foi analisada, e encontra-se na figura 19. É importante conhecermos o perfil de citocinas presentes no coração dos animais infectados, órgão-alvo da infecção por *T. cruzi*, uma vez que, em conjunto com as células presentes no infiltrado inflamatório, pode indicar um mecanismo de controle ou exacerbação da infecção.

Os níveis de citocinas no extrato cardíaco dos animais infectados foi bem inferior àqueles encontrados nos soros dos mesmos animais. Também, entre a maioria das citocinas analisadas, apenas IL-6 e IFNγ encontram-se em níveis mais elevados nos animais KO Gal-1, quando comparados aos animais WT (Figura 19, C e D). A citocina IFNγ é importante na ativação de macrófagos, promovendo sua atividade microbicida, especialmente no contexto da infecção por *T. cruzi*. O excesso de ativação dessas células, porém, pode levar a danos teciduais. Portanto, uma produção bem controlada de IFNγ parece ser importante no controle eficiente da infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992, ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996, CARDILLO *et al.*, 1996, ANTUNEZ; CARDONI, 2000, ABEL *et al.*, 2001, UNE; ANDERSSON; ORN, 2003, LYKENS *et al.*, 2010).

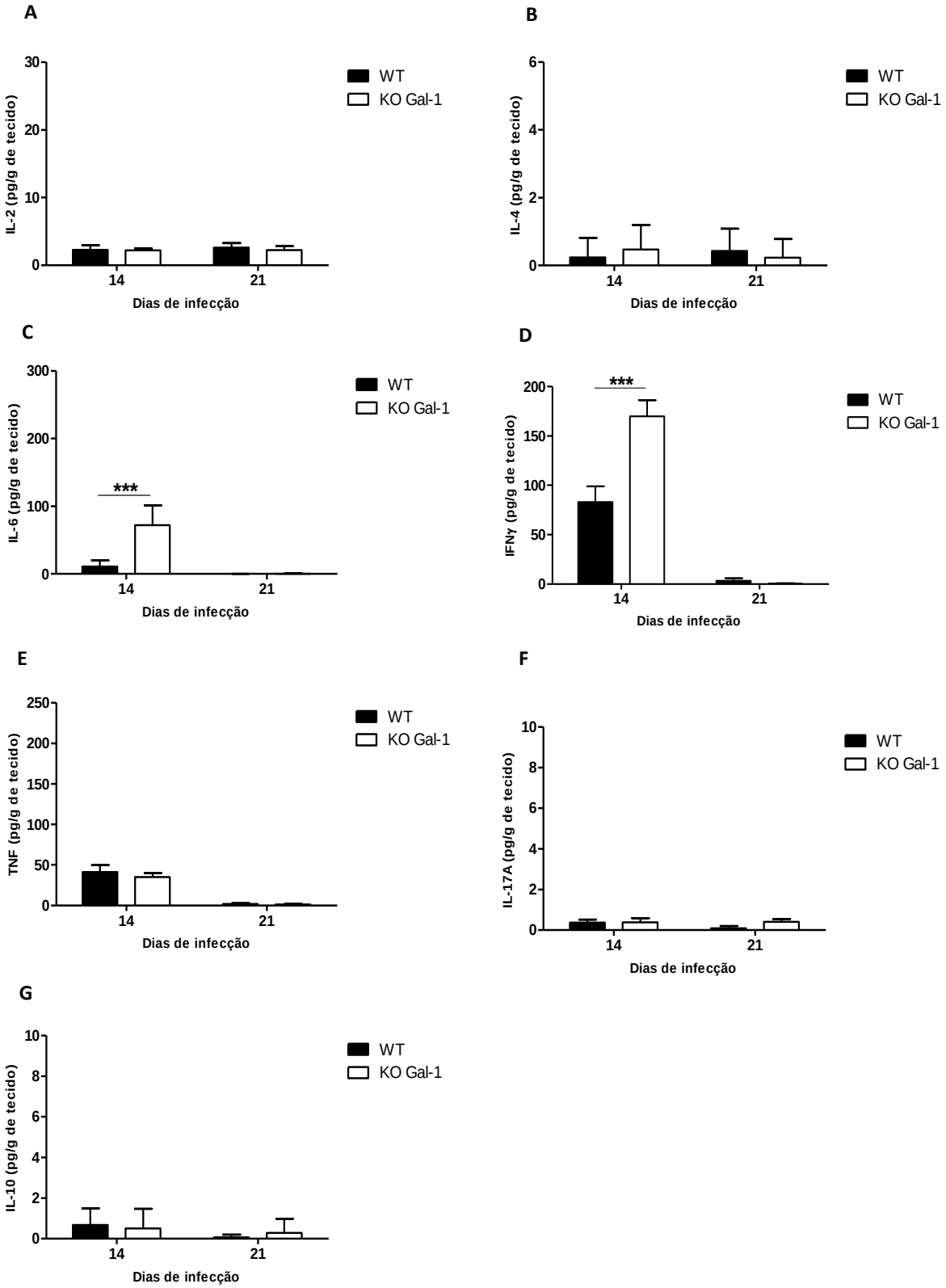


Figura 19 - Quantificação de citocinas no extrato cardíaco de animais WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14 e 21 dias. O tecido cardíaco dos animais infectados foi coletado, processado de forma a se obter um extrato proteico, e as amostras obtidas foram analisadas quanto à concentração de citocinas por CBA *** indica p<0,001.

4.15 Determinação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real

Tendo sido investigada a presença de infiltrado leucocitário no tecido cardíaco dos animais infectados, bem como os tipos celulares envolvidos e o perfil de citocina por eles produzidos, é importante investigar se esta resposta celular controla a replicação do parasita nos animais infectados. Para tanto, a quantificação de *T. cruzi* no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* por 14, 21 e 28 dias foi determinada por *Real-time PCR* (ou PCR quantitativo, *qPCR*) com o auxílio da curva padrão gerada no experimento e está ilustrada na figura 20, cujo gráfico expressa a quantidade de equivalentes de parasita em 10 ng de DNA genômico extraído do coração desses animais. Pode-se observar que a carga de parasitas dos animais WT é maior do que a carga encontrada nos animais KO Gal-1 aos 14 dias de infecção. No entanto, com 21 e 28 dias de infecção essa carga parasitária encontra-se reduzida em ambos os grupos, não havendo mais diferença entre eles (Figura 20).

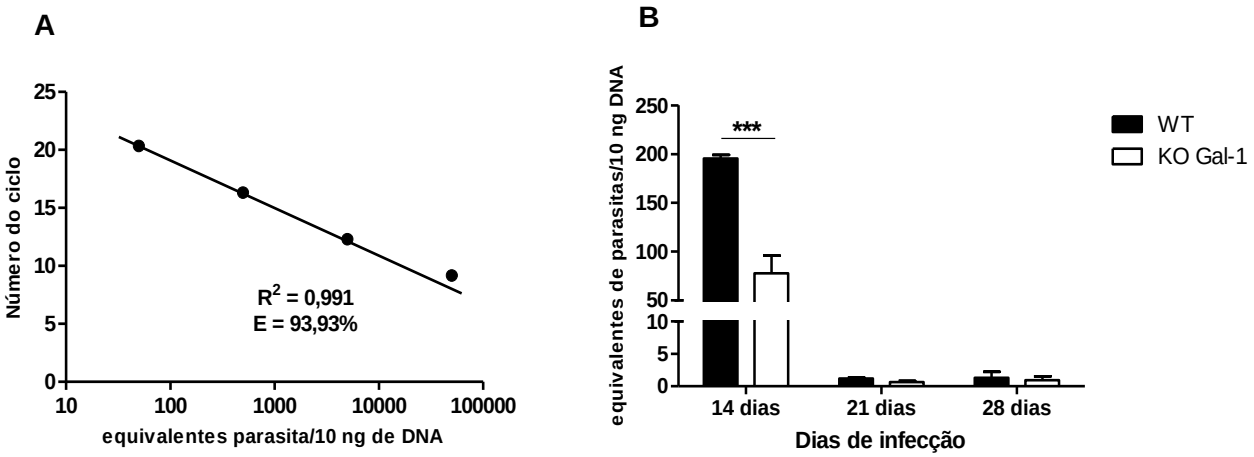


Figura 20 - Quantificação por real-time PCR de *T. cruzi* em DNA de tecido cardíaco extraído de animais infectados. A) Curva padrão obtida para o número do ciclo de detecção correspondente a diferentes concentrações seriadas de DNA de *T. cruzi*. B) carga de parasitas encontrada no tecido cardíaco de camundongos em diferentes dias de infecção. *** indica p<0,001 em relação aos animais WT e KO Gal-1 com 14 dias de infecção.

Cabe ressaltar aqui que a maioria das mortes de animais WT infectados com *T. cruzi* se deu entre 14 e 21 dias de infecção e, ainda, parte dos animais WT dos grupos analisados no presente experimento também morreram próximo ao 14º dia de infecção. Desta forma, temos um indício de que a morte dos camundongos WT pode ser dar devido a uma exacerbação da replicação do parasita no tecido cardíaco desses animais. O perfil de células infiltradas no coração de animais KO Gal-1, bem como o conjunto das citocinas produzidas nesse período específico de 14 dias de infecção podem explicar o controle mais eficiente da replicação do *T. cruzi* nesses animais.

4.16 Avaliação do impacto da Gal-1 endógena sobre a liberação de formas tripomastigotas e a produção de óxido nítrico por células peritoneais aderentes infectadas com *T. cruzi*

Para avaliar se a ausência de Gal-1 endógena influencia a atividade tripanocida de macrófagos peritoneais, visto que são as primeiras células infectadas pelo *T. cruzi* quando suas formas tripomastigotas são injetadas no peritôneo (Figura 21), 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 (KO Gal-1) ou não (WT) do gene da galectina-1 e elicitadas por tioglicolato foram lavadas, colocadas em placa de cultura para adesão e infectadas com formas tripomastigostas de *T. cruzi*. 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 21.

Notamos que, até o terceiro dia de infecção, não há uma liberação significativa de tripomastigotas pelos macrófagos provenientes de animais selvagens ou KO Gal-1 (Figura 21). 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 do que nos animais KO 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 KO Gal-1.

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 21B. Podemos notar que há um acúmulo maior de nitrito no sobrenadante de cultura das células provenientes de animais KO Gal-1 em relação aos animais selvagens com dois dias de infecção. 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 KO Gal-1. 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.

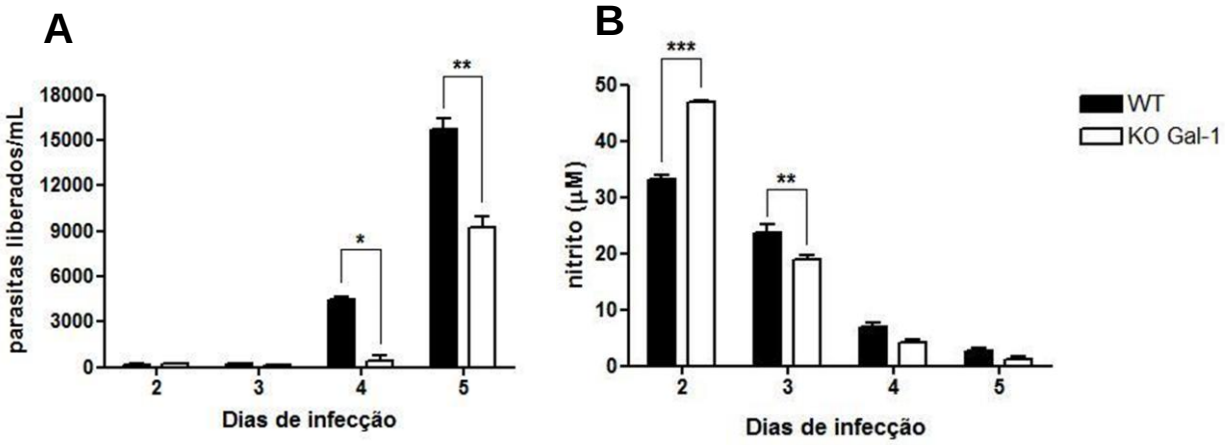


Figura 21 – Avaliação da participação da Gal-1 endógena na atividade tripanocida de macrófagos infectados com *T. cruzi*. Células aderentes provenientes do peritôneo de camundongos C57BL/6 destituídos (Gal-1$^{-/-}$) ou não (Gal-1$^{+/+}$) do gene da galectina-1 foram infectados formas tripomastigotas 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. Discussão

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pudemos explorar diversos aspectos da participação da Gal-1 endógena na evolução da infecção experimental aguda por *T. cruzi*, bem como o efeito da administração de Gal-1 recombinante humana exógena neste mesmo modelo.

Um efeito importante é o de que Gal-1 se liga a superfície de *T. cruzi* de maneira dose-dependente, e que essa ligação ocorre via o reconhecimento de carboidratos na superfície do parasita, uma vez que é inibida com lactose (Figura 4). Apesar de vários dados da literatura mostrarem a interação direta de Gal-1 com a superfície de células de mamíferos (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003, LEPPANEN *et al.*, 2005, FULCHER *et al.*, 2006), não encontramos relatos na literatura sobre a ligação de Gal-1 na superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Entretanto, já foi descrito que outras galectinas, como a Gal-3, podem interagir com este parasita de modo carboidrato dependente e favorecer o seu processo de adesão e invasão celular, ligação a componentes da matrix extracelular e tráfego intracelular deste parasita (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2000, KLESHCHENKO *et al.*, 2004, CARDENAS *et al.*, 2010, NDE *et al.*, 2012, MACHADO *et al.*, 2014). Com base em relatos da literatura sobre a potencial atuação das galectinas como *"pattern recognition receptors – PRRs"* por interagirem com estruturas "non-sef" expressas em patógenos "*pathogen associated molecular patterns – PAMPs*" (SATO *et al.*, 2009; BAUM *et al.,* 2014) e em nossos achados, aparentemente pioneiros, sobre a interação direta da Gal-1 com formas tripomastigotas (Figura 4), sugerimos que esta lectina possa reconhecer glicanas "*non-self*" na superfície de *T. cruzi*. Entretanto, segundo alguns autores as galectinas não poderiam ser classificadas como um PRR pois estas lectinas reconhecessem glycanas "self" (VASTA *et al.*, 2012). Por outro lado, esta lectina pode ser classificada com um *"damage-associated molecular patterns-DAMPs"*, pois a Gal-1 apresenta funções extra e intracelulares, é secretada por mecanismo independente do sistema retículo endoplasmático-Golgi e associado a lesão tecidual, modula a resposta inflamatória em condições patológicas, participa da homeostase tecidual e interage com patógenos (VAN CROMBRUGGEN *et al.*, 2013).

A ligação de Gal-1 a moléculas da superfície de *T. cruzi*, no entanto, não leva à morte das formas tripomastigotas do parasita, conforme mostra a Figura 5. Há relatos recentes na literatura de que galectinas podem induzir a morte de *Candida* sp. (KOHATSU *et al.*, 2006) e bactérias (STOWELL *et al.*, 2010, SURYAWANSHI *et al.*, 2013, ARASU *et al.*, 2014) por reconhecimento de ligantes específicos nas células destes microrganismos. No entanto, não pudemos observar este fenômeno para as formas de *T. cruzi* infectantes de mamíferos. Tal fenômeno pode se dar pela diferença de glicosilação entre as espécies avaliadas: *Candida* sp., *E. coli* e *T. cruzi* são classificados em reinos diferentes, podendo apresentar padrões de glicosilações distintos entre si (VASTA *et al.*, 2012). Essa propriedade de glicosilação diferencial levaria a padrões distintos de reconhecimento de glicanas na superfície desses microrganismos por Gal-1 e, portanto, a um efeito diferente em cada uma dessas células (SATO *et al.*, 2009, BERNARDI *et al.*, 2013). Uma melhor avaliação da ligação de Gal-1 a moléculas específicas da superfície de *T. cruzi* se faz necessária para compreender melhor o efeito da ligação desta lectina nesse parasita.

Sabendo que Gal-1 se liga à superfície de *T. cruzi* (Figura 4) sem induzir a morte das formas tripomastigotas do parasita (Figura 5), investigamos se essa ligação pode interferir na entrada de *T. cruzi* a células de mamífero. Conforme observado na Figura 6, a adição de Gal-1 exógena a células de *T. cruzi* impede a entrada do parasita a fibroblastos LLCMK2. Proteínas glicosiladas na superfície de *Trypanosoma cruzi* são moléculas importantes no mecanismo de invasão de células de mamíferos por esse parasita (TURNER; LIMA; VILLALTA, 2002, ASHMUS *et al.*, 2013), estando envolvidas no contato do parasita com moléculas na superfície celular do hospedeiro. A afinidade de Gal-1 por moléculas glicosiladas na superfície de *T. cruzi,* como glicanas com galactose terminal, modificadas ou não pela adição de ácido siálico na posição α2-3 em mucinas do parasita (CAMPO *et al*., 2014), pode impedir o contato deste parasita com a célula-alvo, dificultando assim sua entrada. Recentemente, Campo e colaboradores (2014) demonstraram que anticorpos policlonais anti-mucinas sintéticas, as quais mimetizam mucinas glicosiladas da superfície de *T. cruzi*, bloqueiam a entrada desse parasita em fibroblastos LLCMK2. Uma vez que Gal-1 tem afinidade por resíduos glicosilados, é possível que esta lectina esteja

atuando da mesma forma que tais anticorpos, bloqueando assim o processo de invasão de *T. cruzi* às células do hospedeiro.

Sabendo que a presença de Gal-1 exógena impede a entrada de *T. cruzi* em fibroblastos, nosso próximo passo foi investigar se esse bloqueio também ocorre em macrófagos, células importantes no controle da replicação do parasita (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994, SILVA *et al.*, 1995). Conforme observado na Figura 7, o tratamento de formas tripomastigotas do parasita com Gal-1 impede a entrada de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais de camundongo. A presença de proteínas glicosiladas na superfície de *T. cruzi* também é importante tanto na adesão como na entrada do parasita nos macrófagos (VILLALTA *et al.*, 1999, FERNANDES; ANDREWS, 2012). É possível, portanto, que Gal-1 esteja bloqueando o processo de adesão e entrada dos parasitas em macrófagos de forma semelhante ao que ocorre nos fibroblastos (Figura 6). No entanto, tanto invasão ativa dos parasitas como o processo de fagocitose são bastante complexos, envolvendo diversos mecanismos, moléculas e estruturas celulares (DE SOUZA *et al.*, 2010). Portanto, outros ensaios são necessários para entender como se dá a participação da Gal-1 na inibição estes processos.

O bloqueio da entrada de *T. cruzi* nas células do hospedeiro é um evento importante no controle da replicação deste protozoário (TURNER; LIMA; VILLALTA, 2002). Porém a atividade tripanocida de macrófagos infectados, por meio da produção de óxido nítrico, é um dos principais mecanismos envolvidos no controle de *T. cruzi* desde as primeiras etapas do estabelecimento desta infecção (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). Dessa forma, investigamos o efeito do tratamento com Gal-1 em macrófagos murinos infectados previamente com este parasita, e observamos que Gal-1 aumenta a produção de óxido nítrico nestes macrófagos e, paralelamente, diminui a liberação de parasitas para o meio (Figura 8). O efeito do tratamento com Gal-1 *in vitro* no modelo de macrófagos infectados com *T. cruzi* já foi estudado (ZUÑIGA *et al*., 2001). Neste trabalho, macrófagos isolados do baço de camundongos infectados por 15 dias pela cepa Tulahuén de *T. cruzi* foram isolados, e o efeito de Gal-1 *in vitro* foi dose-dependente: baixas concentrações de Gal-1 (0,04 µg/mL) aumentaram a replicação do parasita, diminuiu a produção de nitritos e a produção de IL-12, citocina crítica para a morte do parasita. Já concentrações maiores de Gal-1 (0,4 e 4 µg/mL) inibiram a replicação de *T. cruzi*, porém não aumentaram a produção

de IL-12 nem a concentração de nitritos, uma vez que tais concentrações levaram á apoptose dos macrófagos infectados. Tais condições experimentais diferem bastante da metodologia empregada em nosso presente trabalho, uma vez que utilizamos outra cepa de *T. cruzi* (cepa Y em vez de Tulahuén), e fizemos a infecção de macrófagos peritoneais *in vitro*, e não extraímos macrófagos do baço de animais infectados (ZUÑIGA *et al*., 2001). Ainda, utilizamos uma concentração de Gal-1 mais alta do que as concentrações utilizadas no trabalho em discussão: utilizamos 10 µM, equivalente a 150 µg/mL de Gal-1, enquanto que a maior concentração utilizada por Zuñiga e colaboradores (2001) foi de 4 µg/mL, equivalente a aproximadamente 2,5 µM de Gal-1. Os autores relacionam a diminuição da liberação de formas tripomastigotas para o sobrenadante da cultura com a apoptose das células infectadas, por diversas técnicas. Não avaliamos o potencial da Gal-1 causar apoptose dos macrófagos infectados por *T. cruzi*, porém nossos dados sugerem indiretamente que as células permaneceram viáveis, pois mesmo após 4 e 5 dias de cultura, foi possível detectar uma alta produção de óxido nítrico, em relação aos macrófagos infectados e não tratados (Figura 8). No entanto, sabe-se também que os macrófagos encontrados no baço diferem quanto à sua fisiologia e imunogenicidade de macrófagos encontrados no peritônio de camundongos (Liu *et al*., 2006). Este aspecto deve ser considerado na comparação de nossos resultados com aqueles publicados por Zuñiga e colaboradores (2001), já que o modelo de macrófago estudado foi diferente. Um estudo mais recente ainda demonstra a existência de duas populações fisiológica e funcionalmente diferentes de macrófagos peritoneais em camundongos (GHOSN *et al.*, 2010). Uma, denominada *large peritoneal macrophages* (LPM) é encontrada em cavidades peritoneais não estimuladas com LPS ou tioglicolato, enquanto que os *small peritoneal macrophages* (SPM) derivam de monócitos sanguíneos após recrutamento por LPS ou tioglicolato na cavidade, e respondem diferentemente *in vitro* quando estimulados com LPS quanto à produção de NO em relação aos LPM (GHOSN *et al*., 2010). Este é mais um aspecto a ser considerado em nosso trabalho, já que utilizamos macrófagos peritoneais elicitados por tioglicolato. Será necessário avaliar a produção de óxido nítrico frente ao tratamento com Gal-1 em macrófagos de cavidades peritoneais não-estimuladas, a fim de

comprovar se a fisiologia distinta entre as populações de macrófagos peritoneais tem algum reflexo frente ao estímulo com Gal-1.

Ainda, Gal-1 pode estar agindo diretamente nos macrófagos, e assim, de alguma forma, bloqueando a interação desse fagócito com o parasita, ou mesmo interferindo em algum mecanismo envolvido no processo dinâmico que é a fagocitose. É descrito na literatura que receptores do tipo *TOLL* (TLRs) são importantes no início da resposta imunológica inata (DOYLE; O'NEILL, 2006) e também no processo de fagocitose de agente patogênicos, como bactérias (BLANDER; MEDZHITOV, 2004). Também há relatos de que os TLRs são altamente glicosilados (AMITH *et al.*, 2010), e que Gal-1 pode inibir a ativação de TLR-4, receptor importante na montagem da resposta contra *T. cruzi* (OLIVEIRA *et al*., 2010) por se ligar a β-galactosídeos contendo ácido siálico α-2,3 nesse receptor (AMITH *et al*., 2010). Dessa forma, um dos possíveis mecanismos pelo qual a Gal-1 pode reduzir o número de *T. cruzi* internalizados por macrófagos seria o bloqueio da ativação de TLR-4, prejudicando assim a adequado processo de fagocitose (AMITH *et al*., 2010; BLANDER; MEDZHITOV, 2004). Para tentar provar essa hipótese, necessitamos realizar novo experimento de fagocitose de *T. cruzi* na presença e na ausência de Gal-1 recombinante com macrófagos destituídos do gene para TLR-4 (TLR-4 KO), e verificar, assim, se há alteração no número de formas tripomastigotas internalizadas nessas condições, em relação ao experimento realizado com macrófagos WT (Figura 7).

Apesar dos resultados promissores no controle da replicação de *T. cruzi* (Figura 8) e das diversas etapas de purificação para o uso de Gal-1 exógena em nossos experimentos, investigamos se a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais frente ao tratamento com Gal-1 exógena (Figura 8B) poderia ser devido a contaminação por LPS proveniente da etapa de purificação dessa lectina por *E. coli* (Figuras 1 e 2). Para tanto, usando como controle a produção de óxido nítrico de uma curva dose-resposta com LPS ultra-puro e IFN γ, observamos o acúmulo de nitrito no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais de camundongos WT e TLR4 KO frente ao tratamento com doses crescentes de Gal-1, cujos resultados encontram-se na Figura 9. Dessa forma, observado que Gal-1, na presença de IFNγ, induz a produção de óxido nítrico de

maneira dose-dependente em macrófagos, de maneira independente da ativação de TLR4.

Alguns trabalhos da literatura relatam que Gal-1 inibe a produção de óxido nítrico por vários mecanismos, entre eles inibição da expressão de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (ZUÑIGA *et al*., 2001; CORREA *et al*., 2003). Portanto, nossos achados de que Gal-1 estaria induzindo a produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos selvagens relacionou-se, inicialmente, à ativação de TLR-4 por LPS contaminante dessas amostras (AKIRA; TAKERA, 2004, LU *et al*., 2008). Para testar esta hipótese, fez-se a cultura de macrófagos peritoneais murinos selvagens e também daqueles destituídos do gene para TLR-4 na presença de Gal-1 com ou sem IFN-γ. Notamos, então, que Gal-1 induziu a produção de óxido nítrico, de maneira dose-dependente, em associação com IFN-γ, tanto em macrófagos selvagens como naqueles TLR-4$^{-/-}$ (Figura 9C). Tal fenômeno nos sugere, portanto, um mecanismo de produção de óxido nítrico por Gal-1 de modo TLR-4-independente. Assim, provavelmente, a aparente contradição entre nossos achados e os relatos de outros (CORREA *et al.,* 2003) pode estar associada a variações metodológicas nos procedimentos de estimulação de macrófagos e a presença de concentrações mais altas de LPS nas preparações de Gal-1 usada por estes pesquisadores em relação as nossas preparações. Alternativamente, as nossas preparações de Gal-1 podem conter outro(s) componente(s) bacteriano(s) capazes de atuarem em outras vias de sinalização macrofágica independente da sinalização via TLR-4 e em sinergismo com IFN-γ, provocando a produção de óxido nítrico mesmo em macrófagos *tlr4*$^{-/-}$. Dados da literatura mostram que a produção de óxido nítrico por macrófagos podem ocorrer por via independente à sinalização de Myd88 e dependente de inflamossomas (BUZZO *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* sobre o uso de Gal-1 exógena na infecção por *T. cruzi* ajudam a construir uma importante base para o conhecimento dos possíveis mecanismos envolvidos no controle da replicação desse parasita. No entanto, estudo *in vivo* merecem atenção especial, uma vez que nos fornecem informações do curso da infecção num modelo experimental bem conhecido, como a infecção experimental aguda em camundongos (BRENER; GAZZINELLI, 1997, COELHO *et al.*, 2002, MELO *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2010). Para

tanto, a parasitemia de camundongos WT e TLR4 KO infectados com *T. cruzi* e tratados com Gal-1 durante a fase aguda da infecção foi observada e seu perfil encontra-se na Figura 10. É interessante observar que o tratamento com Gal-1 reduziu a parasitemia tanto nos animais WT como naqueles TLR4 KO, quando comparados aos controles tratados apenas com veículo.

Diversos trabalhos avaliaram o potencial da administração *in vivo* de Gal-1 exógena em modelos de doenças inflamatórias (SANTUCCI *et al*., 2000; SANTUCCI *et al*., 2003; TOSCANO *et al*., 2006; PERONE *et al*., 2006). Porém, não há nenhum relato desse tipo de intervenção terapêutica no modelo de infecção murina por *T. cruzi*. Como observamos uma redução significativa na parasitemia de camundongos selvagens tratados com Gal-1 recombinante (Figura 10A), achamos necessário fazer um controle com animais que não respondem ao LPS, pois, novamente, a sua presença como contaminante das alíquotas de Gal-1 poderia estar ativando os macrófagos infectados via produção de óxido nítrico, mascarando assim o efeito da Gal-1 (AKIRA; TAKEDA, 2004; LU *et al*., 2008,). Dessa forma, camundongos destituídos do gene para TLR4 (TLR4 KO) também foram infectados com *T. cruzi* e tratados com Gal-1. Assim, o efeito de uma possível produção de óxido nítrico devido à ativação de TLR4 por LPS contaminante seria eliminada, e realmente foi o que observamos (Figura 10B). A diminuição da carga parasitária no sangue dos camundongos TLR4 KO infectados e tratados com Gal-1 foi semelhante àquela observada em camundongos selvagens (Figura 10A). Portanto, o efeito de Gal-1 na redução da parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* deve envolver mecanismos independentes de TLR4. Como a administração de Gal-1 foi feita no peritônio dos animais infectados, mesma via por onde são injetadas as formas tripomastigotas de *T. cruzi* para sua infecção, o efeito desta lectina pode se dar nos estágios iniciais da infecção dos macrófagos peritoneais, modulando sua fagocitose e/ou alterando o estado de ativação destes fagócitos, conforme observamos nas Figuras 7 e 8.

O envolvimento de Gal-1 endógena na evolução da infecção aguda por *T. cruzi* também foi avaliado. Para tanto, camundongos WT e camundongos destituídos do gene para Gal-1 (Gal-1 KO) foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi,* e tiveram sua parasitemia e taxa de mortalidade acompanhadas durante a fase aguda da infecção (Figuras 11 A e B,

respectivamente). Pudemos observar que os camundongos WT apresentaram maiores níveis de parasitemia em relação aos animais KO Gal-1, especialmente no 9º dia após a infecção (Figura 11A). Ainda, as taxas de mortalidade de camundongos WT e KO Gal-1 infectados com *T. cruzi* foram acompanhadas diariamente durante 50 dias de infecção (Figura 11B). Nota-se que o grupo de animais WT apresentou um índice de mortalidade significativamente maior do que o grupo de animais KO Gal-1. Em experimentos anteriores para a observação da mortalidade destes animais, foi utilizada uma carga de 1000 tripomastigotas, e o resultado foi semelhante ao da Figura 11B (dados não mostrados). A linhagem de camundongos C57BL/6 apresenta maior resistência a alguns modelos de infecções em relação a outras linhagens, como BALB/c, por exemplo (SANTOS *et al.*, 2006). Porém pudemos observar que uma parcela significativa dos animais C57BL/6 infectados com apenas 1000 tripomastigotas da cepa Y morrem durante o intervalo de tempo considerado para a observação de mortalidade. Uma possível explicação para essa alta mortalidade dos animais selvagens em relação aos animais KO Gal-1 seria a mesma utilizada para justificar a maior parasitemia dos animais selvagens: a expressão constitutiva de Gal-1 criaria um ambiente imunomodulado, que desfavoreceria o controle da replicação de *T. cruzi*.

Diversos dados da literatura mostram que elevadas taxas de parasitemia se relacionam positivamente com elevadas taxas de mortalidade de animais infectados por *T. cruzi*. Entretanto, como sugerido pelos nossos achados de parasitemia e sobrevivência, outros pesquisadores descreveram que nem sempre ocorre uma relação positiva entre estes dois parâmetros biológicos da evolução da infecção experimental por *T. cruzi* (MUKHERJEE *et al.,* 2011; TOSELLO-BOARI *et al.,* 2012). A mortalidade de animais infectados por *T. cruzi* na fase aguda da infecção está associada a deficiência de uma resposta imune inata relacionada a liberação/secreção de citocinas e a consequente sinalização mediada por estes mediadores denominada "*cytokine storm*" (MUKHERJEE *et al.*, 2011). Entretanto, a continuidade deste processo "*cytokine storm*" e a ocorrência de resposta inflamatória desregulada podem conduzir a danos teciduais e a morte dos animais infectados (MARIANO *et al.*, 2008, PEREZ *et al.*, 2011). Para tanto, esse processo precisa ser extremamente regulado.

De forma a investigar que tipo de mecanismos estariam envolvidos no controle inicial da infecção por *T. cruzi*, avaliamos o perfil de células imunológicas circulantes no sangue dos animais infectados, bem como as populações predominantes dessas células em seu peritônio após os primeiros dias de infecção. Pode-se observar que, no quinto dia após a infecção, quando os parasitas começam a aparecer na circulação sanguínea, a população de neutrófilos no sangue dos camundongos WT é maior do que aquela observada nos animais KO Gal-1 (Figura 13). Ainda, após 24 horas da infecção dos camundongos com *T. cruzi* via intraperitoneal, a quantidade de neutrófilos encontrada na cavidade peritoneal dos animais KO Gal-1 é superior àquela encontrada nos animais WT (Figura 12). No extrato do tecido cardíaco de camundongos KO Gal-1 também foi detectada uma maior atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), predominantemente produzida por neutrófilos, indicando uma maior presença dessas células no coração dos animais KO Gal-1 em relação aos animais WT (Figura 15A). Já foi descrito na literatura que Gal-1 inibe a adesão e transmigração de neutrófilos e outros leucócitos da circulação para diferentes tecidos (LA *et al.*, 2003, HE; BAUM, 2006, COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008). Assim, sua ausência nos camundongos KO Gal-1 pode facilitar a migração de neutrófilos frente ao estímulo causado pela presença do *T. cruzi* na cavidade peritoneal: algumas moléculas na superfície desse parasita são capazes de atrair leucócitos (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001, COELHO *et al.*, 2002). Além disso, a IL-17A pode induzir indiretamente o recrutamento de neutrófilos via estimulação da produção de quimiocinas, como CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL2 e CXCL8 (PELLETIER; SATO, 2002, TOSELLO BOARI *et al.*, 2012). Em nossos estudos, encontramos uma alta produção de IL-17A no soro dos animais KO Gal-1 durante a infecção por *T. cruzi* (Figura 18F), o que poderia contribuir para a produção dessas quimiocinas importantes no recrutamento de neutrófilos. Ainda, os neutrófilos são células importantes no controle da infecção por *T. cruzi* por diferentes mecanismos, seja pela fagocitose desse parasita, ou pela secreção de moléculas que danificam sua célula (VILLALTA; KIERSZENBAUM, 1983, APPELBERG, 2007, JOHNSON *et al.*, 2013, LUNA-GOMES *et al.*, 2014). Em conjunto, tais dados indicam que o maior recrutamento de neutrófilos, tanto para a cavidade peritoneal onde a infecção se inicia, como

no coração, que é um dos órgãos alvos do parasita, podem levar ao controle da replicação de *T. cruzi* observada nos camundongos KO Gal-1 infectados.

O recrutamento de células inflamatórias, como os neutrófilos, pode auxiliar no controle da replicação de *T. cruzi*. Porém esse fenômeno deve ser muito bem controlado pelo hospedeiro, caso contrário, o infiltrado inflamatório excessivo e persistente pode levar a danos teciduais deletérios. Na Figura 14, temos uma série de fotomicrografias que mostram a evolução do infiltrado leucocitário inflamatório no coração de camundongos WT e KO Gal-1 em diferentes períodos de infecção. Pode-se observar que o aspecto íntegro do tecido cardíaco em ambos os grupos permanece até o 7º dia após a infecção. No 14º dia, no entanto, notamos um aumento no infiltrado celular leucocitário em ambos os grupos. Esse infiltrado celular, no entanto, difere no seu perfil entre os dois grupos de camundongos infectados, evidenciado pelo ensaio de atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glicosaminidase: os animais KO Gal-1 apresentam predominância de neutrófilos (Figura 15A), enquanto que os animais WT apresentam maior número de macrófagos infiltrados (Figura 15B). É possível notar, ainda, que no 21º dia de infecção o infiltrado celular inflamatório persiste no coração dos animais WT, enquanto que praticamente desaparece nos camundongos KO Gal-1 infectados (Figura 14). Neutrófilos são células componentes da imunidade inata que são rapidamente recrutadas para os locais de inflamação, e também são eliminados rapidamente desses tecidos, uma vez que são células de vida curta (SCHEEL-TOELLNER *et al.*, 2004). Tal característica dessas células pode explicar a diminuição do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco dos camundongos KO Gal-1 após 21 dias de infecção: os neutrófilos são recrutados rapidamente da circulação (em que já são abundantes nesses animais, conforme Figura 13) pro coração (Figura 14 e 15), porém logo desaparecem pelo *clearance* natural dessas células pelos macrófagos residentes do tecido (BRATTON; HENSON, 2011). Já os camundongos WT apresentam predominância de monócitos, precursores de macrófagos, em sua circulação em todos os estágios da infecção aguda por *T. cruzi* (Figura 13), além de apresentar maior infiltrado de macrófagos no peritônio após a infecção (Figura 12), e no coração dos animais infectados por 14 dias (Figura 15). Os macrófagos possuem a característica de migrarem mais lentamente para os tecidos inflamados do que os neutrófilos (MOSER *et al.*, 2004, MARTIN; TARLETON,

2005). São ainda células bem descritas como importantes no controle da replicação de *T. cruzi* por diversos mecanismos (DRAPIER; WIETZERBIN; HIBBS, 1988, GAZZINELLI *et al.*, 1992, SILVA *et al.*, 1995, MELO, 2009, ALVAREZ *et al.*, 2011). No entanto, os macrófagos precisam de uma ativação adequada para que sejam eficazes no controle da replicação do parasita, e uma das maneiras promover as atividades microbicidas dos macrófagos e a produção de determinadas citocinas. Duas importantes citocinas na indução da morte de *T. cruzi* por macrófagos são IFNγ e TNF (DRAPIER; WIETZERBIN; HIBBS, 1988, HUNTER; SLIFER; ARAUJO, 1996, SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003, MELO, 2009). Tais citocinas encontram-se em níveis semelhantes no soro dos camundongos WT e KO Gal-1 infectados por *T. cruzi* por 14 dias (Figura 18 D e E). Já no tecido cardíaco, IFNγ encontra-se em níveis elevados apenas nos camundongos KO Gal-1, no mesmo período de infecção (Figura 19 D). A presença dessa citocina no coração de camundongos KO Gal-1 durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* pode levar à ativação dos macrófagos presentes nesse tecido, aumentando sua eficiência no controle da replicação deste parasita. Apesar dos animais WT apresentarem maior quantidade de macrófagos no tecido cardíaco com 14 dias de infecção em relação aos animais KO Gal-1 (Figura 15B), a presença de IFNγ em maior quantidade no mesmo período de tempo no coração de animais KO Gal-1 pode levar a um controle mais eficiente da replicação de *T. cruzi* nesses animais. Um reflexo da maior atividade de *killing* pelos macrófagos ativados por IFNγ nos camundongos KO Gal-1 é evidenciada pela menor carga de parasitas encontrada nesses animais por *real-time PCR* com 14 dias de infecção (Figura 20). Animais WT infectados por *T. cruzi*, no entanto, apresentam maior número de linfócitos T $CD4^+$ em seu tecido cardíaco em relação aos animais KO Gal-1 (Figura 16A). Os linfócitos T $CD4^+$ constituem uma população de linfócitos conhecida como linfócitos T auxiliares (ou *helpers*), importantes produtores de citocinas pró- e anti-inflamatórias (HOFT *et al.*, 2000, GALVAO DA SILVA; JACYSYN; DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, 2003, NOMIZO *et al.*, 2005). Tais citocinas podem ativar macrófagos (IFNγ e TNF), promover a diferenciação de outras células T (T regulatórias com IL-4 e IL-10, ou T_H17 com IL-6 e TGFβ, por exemplo) (BETTELLI *et al.*, 2006, MCGEACHY *et al.*, 2007, ZHOU *et al.*, 2007), ou ainda promover a secreção de quimiocinas importantes no recrutamento de outros

leucócitos (MOSER *et al.*, 2004). No entanto, é interessante observar que, apesar dos camundongos WT apresentarem predominância de células T $CD4^+$ em seu coração durante o curso da infecção por *T. cruzi* (Figura 16A), a produção de citocinas por esses animais não foi a esperada para tal abundância de linfócitos T $CD4^+$. Já os camundongos KO Gal-1, apesar da menor população de linfócitos T $CD4^+$ no coração, apresentam maior concentração de diversas citocinas no soro (Figura 18) e de IFNγ e IL-6 no tecido cardíaco (Figura 19) e, dessa forma, aparentam controlar melhor a replicação de *T. cruzi* durante o ciclo de infecção aguda.

Outro tipo de célula presente no coração dos camundongos KO Gal-1 infectados após 21 dias foram os linfócitos T $CD8^+$ (Figura 16B). Grande parte da população desses linfócitos exerce função de células T citotóxicas, importantes no controle de células infectadas por patógenos intracelulares, como o *T. cruzi* (TARLETON, 1990, WIZEL *et al.*, 1998, MARTIN *et al.*, 2006, TZELEPIS *et al.*, 2006). A eliminação de células infectadas por parasitas, através da atividade de células T CD8 citotóxicas pode ser um dos mecanismos de eliminação do parasita do tecido cardíaco utilizada pelos animais KO Gal-1. Porém linfócitos, T $CD8^+$ podem ter outras funções, como secreção de citocinas, e não pudemos esclarecer qual o papel exato dessas células no tecido cardíaco dos camundongos KO Gal-1 no contexto de nossa infecção experimental. Entretanto, os nossos achados estão de acordo com relatos da literatura que mostram uma rejeição acelerada de enxertos em animais Gal-1 KO, em comparação com animais selvagens, em função de um aumento de porcentagem de células T $CD8^+$ antígeno-especificas e uma secreção preferencial de IFN-γ e IL-17 por estas células T $CD8^+$ (MOREAU *et al.*, 2012).

Outra importante citocina no controle da infecção por *T. cruzi* é a IL-17 (DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010, MIYAZAKI *et al.*, 2010, TOSELLO BOARI *et al.*, 2012, ERDMANN *et al.*, 2013). Além de promover mecanismos de controle da replicação do parasita pelos macrófagos, como a produção de citocinas ou mesmo impedindo o parasita se sair da célula infectada (MIYAZAKI *et al*., 2010; ERDMANN *et al*., 2013), esta citocina ainda regula o fluxo de células inflamatórias para o tecido cardíaco, que auxiliam no controle do parasita, ou ainda que previnem a danos provenientes da inflamação (DA MATTA-GUEDES, *et al*., 2010; TOSELLO-BOARI, *et al*., 2012). Nesse contexto, pudemos observar

que os camundongos KO Gal-1 apresentaram uma alta concentração de IL-17A em seu soro com 14 dias de infecção (Figura 18F). Ao 21º dia de infecção, no entanto, essa citocina já não é mais detectada. Este pode ser um indício de que a produção de IL-17A nos camundongos KO Gal-1 é muito bem regulada, sendo liberada apenas nos estágios iniciais da infecção, promovendo um controle eficaz da replicação do *T. cruzi*. A produção de IL-17A não foi tão alta nos animais WT, o que consequentemente pode ter prejudicado sua produção de IFNγ, IL-6 e TNF, fundamentais para a ativação dos mecanismos de controle da replicação do parasita pelos macrófagos.

Para investigar se todo o processo de recrutamento de células inflamatórias para o tecido cardíaco e da produção de citocinas por essas células com o objetivo de eliminar o agente infeccioso foi realmente efetivo, avaliamos a carga de parasitas no coração dos camundongos WT e KO Gal-1 infectados por *T. cruzi* por 14, 21 e 28 dias por *real-time PCR* (Figura 20). Dessa maneira, pudemos observar que a carga parasitária dos animais KO Gal-1 infectados é bem menor do que aquela encontrada nos camundongos WT, no 14º dia de infecção. Porém, com 21 e 28 dias de infecção, a quantidade de parasitas detectada nos corações de ambos os grupos encontra-se reduzida em relação ao 14º dia, e não apresentam diferenças entre si. Tal resultado nos indica que tanto os camundongos WT como os KO Gal-1 conseguem controlar a carga parasitária de forma eficiente no início da infecção. Esta é uma característica da resistência que a linhagem C57BL/6 de camundongos apresenta em relação à cepa Y de *T. cruzi*: os camundongos infectados conseguem sobreviver e até eliminar o parasita, dependendo da carga usada na infecção experimental (BORGES *et al.*, 2013, SANOJA *et al.*, 2013). Ainda assim, é interessante observar que os camundongos KO Gal-1 conseguem eliminar os parasitas com maior eficiência logo no início da infecção, quando comparados aos animais WT. O rápido influxo de neutrófilos no tecido cardíaco, bem como a expressão de citocinas que auxiliam no controle do parasita, como IFNγ, IL-6, TNF e IL-17A, se refletem no controle eficiente do parasita nos tecidos observado pela análise de carga parasitária por *Real-time PCR*.

A ativação de células como os macrófagos, bem como o recrutamento de outras células pró-inflamatórias para os tecidos em que o *T. cruzi* está presente, como os neutrófilos, é importante para o controle da multiplicação desse

parasita. No entanto, uma resposta inflamatória exacerbada pode levar a danos teciduais muitas vezes irreversíveis, prejudicando o hospedeiro (HIGUCHI MDE *et al.*, 1993, BRENER; GAZZINELLI, 1997, TALVANI *et al.*, 2000, ABEL *et al.*, 2001, MICHAILOWSKY *et al.*, 2001, TROCOLI TORRECILHAS *et al.*, 2009, PAVANELLI *et al.*, 2010). Uma citocina fundamental no controle da exacerbação de reações inflamatórias é a IL-10 (SILVA *et al.*, 1992, ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996, HUNTER *et al.*, 1997, JANKOVIC *et al.*, 2007, TOSELLO BOARI *et al.*, 2012). Sua produção bem controlada, logo após os primeiros estágios de recrutamento e ativação de células contra o parasita, previne a perpetuação da reação inflamatória no tecido, protegendo o hospedeiro. Seu excesso, no entanto, pode levar a susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (OSWALD *et al.*, 1992, REED *et al.*, 1994, VAN DER LEIJ *et al.*, 2004). A IL-10 inibe a atividade de células NK, Th1 e de macrófagos, importantes no *clearance* dos parasitas, mas que também levam ao dano tecidual. Portanto, o impacto da IL-10 no curso da infecção por *T. cruzi* e outros patógenos depende muito do local e de quando ela é produzida (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). Uma alta produção de IL-10 foi encontrada no soro dos camundongos KO Gal-1 infectados por 14 dias com *T. cruzi* (Figura 18G), sendo que após 21 dias de infecção essa produção foi reduzida acentuadamente. A presença de neutrófilos e outras células ativadas na circulação desses animais, bem como em seu tecido cardíaco, assim como a alta produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-17A, pode ter contribuído para a produção de IL-10 por diversas células. Esse pode ser um mecanismo para explicar a redução do infiltrado inflamatório observado no coração dos animais KO Gal-1 com 21 dias de infecção: a produção de IFNγ, IL-6, TNF e IL-17A contribui no controle do parasita, porém sua persistência pode acarretar em dano tecidual. Uma produção concomitante de IL-10 por esses animais, ainda no começo da infecção, controlaria a exacerbação do processo inflamatório, mas não a ponto de prejudicar o controle do parasita nesse processo.

O envolvimento da Gal-1 endógena na atividade tripanocida de macrófagos peritoneais infectados por *T. cruzi in vitro* também foi investigada. De acordo com a Figura 21, pudemos notar que macrófagos provenientes de animais KO Gal-1 controlaram melhor a liberação de parasitas para o sobrenadante em relação aos macrófagos WT (Figura 21A), assim como

apresentaram maior produção de óxido nítrico (Figura 21B). 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 KO Gal-1 apresentam uma maior produção de óxido nítrico nos primeiros dias de infecção, em relação às células de animais selvagens (Figura 21B). Essa maior produção de óxido nítrico pode estar relacionada com a menor liberação de parasitas pelos macrófagos KO Gal-1 observada com quatro e cinco dias de infecção (Figura 21A). Dessa maneira, os macrófagos KO 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 KO Gal-1 com três dias de infecção (Figura 21B). 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 (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995). Apesar de macrófagos KO 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 21). Isto pode explicar, pelo menos em parte, o melhor controle da infecção por *T. cruzi* pelos animais KO Gal-1, já que esses animais seriam capazes de produzir uma quantidade adequada de NO para matar o parasita, porém sem causar imunossupressão significativa. É interessante lembrar, ainda, que os macrófagos WT infectados por *T. cruzi* e tratados com Gal-1 recombinante humana apresentam um aumento na produção de óxido nítrico em relação aos macrófagos infectados e tratados apenas com PBS (Figura 8B). Essa aparente contradição na atividade de macrófagos WT frente ao tratamento de Gal-1

recombinante provavelmente se deve aos diferentes tipos de estímulos utilizados nos dois experimentos: *T. cruzi* ou LPS em associação ao IFNγ. A infecção por *T. cruzi* nestes fagócitos pode levar a modificações nos receptores celulares ou no tipo de resposta frente a estímulos extracelulares: desta forma, macrófagos infectados por esse parasita ficariam mais sensíveis à presença de Gal-1 exógena no sobrenadante, produzindo assim mais óxido nítrico (Figura 8B). Já o experimento com estímulo por LPS + IFNγ foi realizado em macrófagos peritoneais elicitados com tioglicolato, sem terem sido infectados ou estimulados posteriormente aos tratamentos *in vitro*.

Com relação aos resultados dos ensaios com culturas de diferentes macrófagos, ilustrados nas figuras 8 e 21, estes podem nos sugerir dois fenômenos: (i) O tratamento de macrófagos infectados com Gal-1 exógena pode promover a ativação do NO sintase induzida e a consequente liberação de NO e, (ii) a ausência de Gal-1 endógena favorece a produção de NO de modo mais precoce por macrófagos KO Gal-1 do que os macrófagos WT infectados. Nessa linha, dados da literatura tem mostrado que Gal-1 exógena, em suas formas reduzida e oxidada, podem regular negativamente a produção de NO por macrófagos ativados (ZUNIGA *et al.*, 2001a, CORREA *et al.*, 2003, ECHIGO *et al.*, 2010). Ainda, recentemente foi descrito que Gal-1, endógena e exógena, pode regular negativamente a ativação clássica do padrão M1 de micróglia envolvendo, por exemplo, a redução da expressão da NO sintase induzida por estas células (STAROSSOM *et al.*, 2012). Considerando que o NO participa da defesa contra a infecção por *T. cruzi* (SILVA et al., 1995) e com base nos dados ilustrados nas Figura 8 e 21, sugerimos que a regulação da produção de NO em macrófagos por Gal-1, endógena e exógena, pode estar envolvida no mecanismo da ação anti-parasitária desta galectina.

Trabalhos recentes da literatura (AMITH *et al.*, 2009, AMITH *et al.*, 2010) nos levam a cogitar mais uma hipótese para essas diferenças na produção de óxido nítrico observada nos macrófagos WT e KO Gal-1, frente a diferentes estímulos. Segundo revisado pelos autores (AMITH *et al.*, 2009, AMITH *et al.*, 2010), o receptor TLR4 tem a forma dimérica, encontra-se associado a MD-2 em sua parte interna, e a maior parte da superfície desse receptor apresenta-se altamente glicosilada. Ainda, a ausência de glicosilação, ou defeitos em enzimas responsáveis pela glicosilação e/ou montagem das moléculas componentes do

receptor prejudicam sua ativação e consequente produção de moléculas provenientes de sua ativação. Porém, a presença de ácido siálico na posição α2,3 de resíduos de β-galactosídeos na superfície de TLR4 impede a ativação desse receptor na presença de seus ligantes (AMITH *et al*., 2010). Também foi descrito que neuraminidase-1 (Neu1), enzima responsável pela remoção de ácido siálico desses terminais glicosilados, é importante na ativação de TLR4, e está co-localizada ao receptor na superfície da célula, associada a catepsina A (AMITH *et al*., 2009). Dessa forma, a presença de um ligante de TLR4 gera alterações conformacionais nesse receptor, as quais levam à ativação de Neu1, retirada de ácido siálico α2,3 de β-galactosídeos e consequente ativação do receptor TLR4. Os autores descreveram ainda que, a presença da lectina de *Maackia amurensis* (MAL-2), galectina-1 (que se liga a β-galactosídeos, α2,3-sialilados ou não) e do inibidor de neuraminidase Tamiflu, mas não a lectina α2,6-sialil-específica de *Sambucus nigra* (SNA), são capazes de bloquear a ativação de TLR4 na presença de seus ligantes (AMITH *et al*., 2010). Diante do exposto, acreditamos que a presença de Gal-1 endógena estaria bloqueando em parte a ativação de TLR4 ou TLR2 por agonistas de *T. cruzi* nos macrófagos WT, por bloquear a ação de Neu1 ao se ligar aos terminais α2,3-sialilados desse receptor (AMITH et al.,2009).

Por fim, considerando os efeitos do tratamento de Gal-1 recombinante em macrófagos WT infectados por *T. cruzi*, temos que essa lectina aumenta a produção de óxido nítrico nestas células, comportamento esse contrário ao que seria esperado, caso a Gal-1 exógena estivesse bloqueando a ativação de TLR4 conforme hipótese baseada nos trabalhos citados (AMITH *et al.*, 2009, AMITH *et al.*, 2010). No entanto, a enzima trans-sialidade de *T. cruzi* tem afinidade por resíduos α2,3-sialilados de moléculas do hospedeiro, transferindo essas unidades de ácido siálico para resíduos glicosilados na superfície desse parasita (FRASCH, 2000). Portanto, a própria atividade da trans-sialidase de *T. cruzi* removeria os resíduos de ácido siálico dos β-galactosídeos do receptor dos macrófagos infectados, deixando assim os receptores TLR4 prontos para serem ativados frente a um estímulo. Além disso, agonistas de TRL4 presentes na superfície de *T. cruzi* poderiam ativar a Neu1 do macrófago (AMITH *et al*., 2009). Dessa forma, a adição de Gal-1 recombinante à cultura de macrófagos WT após a infecção por *T. cruzi* poderia estimular as células para produção de NO via o

reconhecimento de resíduos terminais de β-galactosídeos no TLR4 desialilado e/ou outras glicanas presentes na superfícies de macrófagos infectados. Futuros estudos deverão ser realizados para investigar a pertinência desta hipótese.

Em conjunto, podemos considerar que a ausência de expressão da Gal-1 endógena, ou a presença de Gal-1 exógena, possibilita uma série de eventos celulares e moleculares, os quais favorecem a resistência à infecção experimental aguda por *T. cruzi*, *in vivo* e *in vitro*.

6. Conclusão

Concluímos que a ausência de expressão da Gal-1 endógena, ou a presença de Gal-1 exógena, possibilita uma série de eventos celulares e moleculares, os quais favorecem a resistência à infecção experimental aguda por *T. cruzi*, *in vivo* e *in vitro*.

7. Referências

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. **J Autoimmun**, v. 17, n. 1, Aug, p.99-107. 2001.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 155, n. 8, Oct 15, p.3955-3963. 1995.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol**, v. 84, n. 2, Nov, p.231-244. 1996.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, Jul, p.499-511. 2004.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, Feb 24, p.783-801. 2006.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 4, Oct, p.467-477. 2001.

ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **J Biol Chem**, v. 286, n. 8, Feb 25, p.6627-6640. 2011.

AMITH, S. R.; JAYANTH, P.; FRANCHUK, S.; FINLAY, T.; SEYRANTEPE, V.; BEYAERT, R.; PSHEZHETSKY, A. V.; SZEWCZUK, M. R. Neu1 desialylation of sialyl alpha-2,3-linked beta-galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. **Cell Signal**, v. 22, n. 2, Feb, p.314-324. 2010.

AMITH, S. R.; JAYANTH, P.; FRANCHUK, S.; SIDDIQUI, S.; SEYRANTEPE, V.; GEE, K.; BASTA, S.; BEYAERT, R.; PSHEZHETSKY, A. V.; SZEWCZUK, M. R. Dependence of pathogen molecule-induced toll-like receptor activation and cell function on Neu1 sialidase. **Glycoconj J**, v. 26, n. 9, Dec, p.1197-1212. 2009.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, Oct, p.819-823. 2005.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHAES, J. B.; NETTO, M. B. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of Trypanosoma cruzi. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 79, n. 4, Aug, p.397-407. 1985.

ANTUNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental Trypanosoma cruzi infections. **Immunol Lett**, v. 71, n. 2, Feb 1, p.103-109. 2000.

APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by Trypanosoma cruzi requires trypomastigote membranes. **Infect Immun**, v. 72, n. 10, Oct, p.5892-5902. 2004.

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends Microbiol**, v. 15, n. 2, Feb, p.87-92. 2007.

ARASU, A.; KUMARESAN, V.; SATHYAMOORTHI, A.; CHAURASIA, M. K.; BHATT, P.; GNANAM, A. J.; PALANISAMY, R.; MARIMUTHU, K.; PASUPULETI, M.; AROCKIARAJ, J. Molecular characterization of a novel proto-type antimicrobial protein galectin-1 from striped murrel. **Microbiol Res**, v., n., Apr 4. 2014.

ASHMUS, R. A.; SCHOCKER, N. S.; CORDERO-MENDOZA, Y.; MARQUES, A. F.; MONROY, E. Y.; PARDO, A.; IZQUIERDO, L.; GALLEGO, M.; GASCON, J.; ALMEIDA, I. C.; MICHAEL, K. Potential use of synthetic alpha-galactosyl-containing glycotopes of the parasite Trypanosoma cruzi as diagnostic antigens for Chagas disease. **Org Biomol Chem**, v. 11, n. 34, Sep 14, p.5579-5583. 2013.

AUVYNET, C.; MORENO, S.; MELCHY, E.; CORONADO-MARTINEZ, I.; MONTIEL, J. L.; AGUILAR-DELFIN, I.; ROSENSTEIN, Y. Galectin-1 promotes human neutrophil migration. **Glycobiology**, v. 23, n. 1, Jan, p.32-42. 2013.

AYALA, J. M.; GOYAL, S.; LIVERTON, N. J.; CLAREMON, D. A.; O'KEEFE, S. J.; HANLON, W. A. Serum-induced monocyte differentiation and monocyte chemotaxis are regulated by the p38 MAP kinase signal transduction pathway. **J Leukoc Biol**, v. 67, n. 6, Jun, p.869-875. 2000.

BAHIA, M. T.; DINIZ, L. D.; MOSQUEIRA, V. C. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opin Investig Drugs**, v., n., May 26, p.1-13. 2014.

BARONDES, S. H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D. N.; CUMMINGS, R. D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M. A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K.; ET AL. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, Feb 25, p.597-598. 1994.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiases. **Lancet**, v. 362, n. 9394, Nov 1, p.1469-1480. 2003.

BARRIONUEVO, P.; BEIGIER-BOMPADRE, M.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; BIANCO, G. A.; ISTURIZ, M. A.; RABINOVICH, G. A. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. **J Immunol**, v. 178, n. 1, Jan 1, p.436-445. 2007.

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

BAUM LG, GARNER OB, SCHAEFER K. Microbe-host interactions are positively and negatively regulated by galectinglycan interactions. **Front. Immunol**, v. 5, p. 284, doi:10.3389/fimmu.2014.0028

BAUM, L. G.; PANG, M.; PERILLO, N. L.; WU, T.; DELEGEANE, A.; UITTENBOGAART, C. H.; FUKUDA, M.; SEILHAMER, J. J. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. **J Exp Med**, v. 181, n. 3, Mar 1, p.877-887. 1995.

BERMEJO, D. A.; JACKSON, S. W.; GOROSITO-SERRAN, M.; ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; AMEZCUA-VESELY, M. C.; SATHER, B. D.; SINGH, A. K.; KHIM, S.; MUCCI, J.; LIGGITT, D.; CAMPETELLA, O.; OUKKA, M.; GRUPPI, A.; RAWLINGS, D. J. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 5, May, p.514-522. 2013.

BERNARDI, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; CASNATI, A.; DE CASTRO, C.; DARBRE, T.; FIESCHI, F.; FINNE, J.; FUNKEN, H.; JAEGER, K. E.; LAHMANN, M.; LINDHORST, T. K.; MARRADI, M.; MESSNER, P.; MOLINARO, A.; MURPHY, P. V.; NATIVI, C.; OSCARSON, S.; PENADES, S.; PERI, F.; PIETERS, R. J.; RENAUDET, O.; REYMOND, J. L.; RICHICHI, B.; ROJO, J.; SANSONE, F.; SCHAFFER, C.; TURNBULL, W. B.; VELASCO-TORRIJOS, T.; VIDAL, S.; VINCENT, S.; WENNEKES, T.; ZUILHOF, H.; IMBERTY, A. Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. **Chem Soc Rev**, v. 42, n. 11, Jun 7, p.4709-4727. 2013.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, May 11, p.235-238. 2006.

BLANDER, J. M.; MEDZHITOV, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. **Science**, v. 304, n. 5673, May 14, p.1014-1018. 2004.

BLASER, C.; KAUFMANN, M.; MULLER, 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. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 8, Aug, p.2311-2319. 1998.

BLOIS, S. M.; GUEUVOGHLANIAN-SILVA, B. Y.; TIRADO-GONZALEZ, I.; TORLONI, M. R.; FREITAG, N.; MATTAR, R.; CONRAD, M. L.; UNVERDORBEN, L.; BARRIENTOS, G.; KNABL, J.; TOLDI, G.; MOLVAREC, A.; ROSE, M.; MARKERT, U. R.; JESCHKE, U.; DAHER, S. Getting too sweet: galectin-1 dysregulation in gestational diabetes mellitus. **Mol Hum Reprod**, v., n., Apr 7. 2014.

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. **Nat Med**, v. 13, n. 12, Dec, p.1450-1457. 2007.

BONNEY, K. M.; GIFFORD, K. M.; TAYLOR, J. M.; CHEN, C. I.; ENGMAN, D. M. Cardiac damage induced by immunization with heat-killed Trypanosoma cruzi is not antibody mediated. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 1, Jan, p.1-10. 2013.

BORGES, D. C.; ARAUJO, N. M.; CARDOSO, C. R.; LAZO CHICA, J. E. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental Trypanosoma cruzi infection. **Immunology**, v. 138, n. 2, Feb, p.145-156. 2013.

BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. **Trends Immunol**, v. 32, n. 8, Aug, p.350-357. 2011.

BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, n., p.347-382. 1973.

BRENER, Z.; CHIARI, E. [Observations on the chronic phase of experimental Chagas' disease in mice]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 5, n., May-Jun, p.128-132. 1963.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 114, n. 2, Oct, p.103-110. 1997.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; DI NOIA, J. M. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 3, Mar, p.229-236. 2006.

BUZZO, C. L.; CAMPOPIANO, J. C.; MASSIS, L. M.; LAGE, S. L.; CASSADO, A. A.; LEME-SOUZA, R.; CUNHA, L. D.; RUSSO, M.; ZAMBONI, D. S.; AMARANTE-MENDES, G. P.; BORTOLUCI, K. R. A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, Oct 15, p.32087-32095. 2010.

CALDAS, S.; CALDAS, I. S.; DINIZ LDE, F.; LIMA, W. G.; OLIVEIRA RDE, P.; CECILIO, A. B.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental Trypanosoma cruzi infection. **Acta Trop**, v. 123, n. 3, Sep, p.170-177. 2012.

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. **J Immunol**, v. 158, n. 12, Jun 15, p.5890-5901. 1997.

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

CAMPO, V. L.; RIUL, T. B.; CARVALHO, I.; BARUFFI, M. D. Antibodies against Mucin-Based Glycopeptides Affect Trypanosoma cruzi Cell Invasion and Tumor Cell Viability. **Chembiochem**, v., n., Jun 11. 2014.

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. **J Immunol**, v. 167, n. 1, Jul 1, p.416-423. 2001.

CAMPOS, M. A.; CLOSEL, M.; VALENTE, E. P.; CARDOSO, J. E.; AKIRA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J Immunol**, v. 172, n. 3, Feb 1, p.1711-1718. 2004.

CAO, X.; ZHOU, M.; WANG, C.; HOU, L.; ZENG, B. Lectin purified from Musca domestica pupa up-regulates NO and iNOS production via TLR4/NF-kappaB signaling pathway in macrophages. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 4, Apr, p.399-405. 2011.

CARDENAS, T. C.; JOHNSON, C. A.; PRATAP, S.; NDE, P. N.; FURTAK, V.; KLESHCHENKO, Y. Y.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. REGULATION of the EXTRACELLULAR MATRIX INTERACTOME by Trypanosoma cruzi. **Open Parasitol J**, v. 4, n., p.72-76. 2010.

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. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, Jan, p.128-134. 1996.

CEDENO-LAURENT, F.; WATANABE, R.; TEAGUE, J. E.; KUPPER, T. S.; CLARK, R. A.; DIMITROFF, C. J. Galectin-1 inhibits the viability, proliferation, and Th1 cytokine production of nonmalignant T cells in patients with leukemic cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, v. 119, n. 15, Apr 12, p.3534-3538. 2012.

CHEN, H. Y.; WENG, I. C.; HONG, M. H.; LIU, F. T. Galectins as bacterial sensors in the host innate response. **Curr Opin Microbiol**, v. 17, n., Feb, p.75-81. 2014.

CHESSLER, A. D.; UNNIKRISHNAN, M.; BEI, A. K.; DAILY, J. P.; BURLEIGH, B. A. Trypanosoma cruzi triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. **J Immunol**, v. 182, n. 4, Feb 15, p.2288-2296. 2009.

CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; BENVENUTO, G.; BRUNI, C. B. Control of galectin gene expression. **Biochimie**, v. 81, n. 4, Apr, p.381-388. 1999.

CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; FRUNZIO, R.; BRUNI, C. B. Galectin genes: regulation of expression. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p.441-449. 2004.

CHO, M.; CUMMINGS, R. D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, Mar 10, p.5207-5212. 1995.

COELHO, P. S.; KLEIN, A.; TALVANI, A.; COUTINHO, S. F.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; SILVA, J. S.; CANIZZARO, H.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 5, May, p.837-844. 2002.

COOPER, D.; NORLING, L. V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 6, Jun, p.1459-1466. 2008.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. **J Cell Biol**, v. 110, n. 5, May, p.1681-1691. 1990.

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

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

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONCA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 177, n. 5, Sep 1, p.3193-3200. 2006.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J Immunol**, v. 180, n. 9, May 1, p.5771-5777. 2008.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of Trypanosoma cruzi in host tissue by real-time PCR. **Mol Biochem Parasitol**, v. 129, n. 1, Jun, p.53-59. 2003.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F. T. Galectins. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. ETZLER, M. E. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY), 2nd ed., 2009

DA MATTA GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p.e604. 2010.

DE SOUZA, E. M.; NEFERTITI, A. S.; BAILLY, C.; LANSIAUX, A.; SOEIRO, M. N. Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from Trypanosoma cruzi-infected heart cells in vitro. **Cell Tissue Res**, v. 341, n. 1, Jul, p.173-180. 2010.

DIAS-BARUFFI, M.; STOWELL, S. R.; SONG, S. C.; ARTHUR, C. M.; CHO, M.; RODRIGUES, L. C.; MONTES, M. A.; ROSSI, M. A.; JAMES, J. A.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. **Glycobiology**, v. 20, n. 5, May, p.507-520. 2010.

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. **J Biol Chem**, v. 278, n. 42, Oct 17, p.41282-41293. 2003.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, May, p.71R-79R. 2001.

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 9, Oct 30, p.1102-1113. 2006.

DRAPIER, J. C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J. B., JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur J Immunol**, v. 18, n. 10, Oct, p.1587-1592. 1988.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J Biol Chem**, v. 263, n. 20, Jul 15, p.9557-9560. 1988.

ECHIGO, Y.; SUGIKI, H.; KOIZUMI, Y.; HIKITSUCHI, S.; INOUE, H. Activation of RAW264.7 macrophages by oxidized galectin-1. **Immunol Lett**, v. 131, n. 1, Jun 15, p.19-23. 2010.

ERDMANN, H.; ROSSNAGEL, C.; BOHME, J.; IWAKURA, Y.; JACOBS, T.; SCHAIBLE, U. E.; HOLSCHER, C. IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against Trypanosoma cruzi by trapping parasites in the endolysosomal compartment. **Immunobiology**, v. 218, n. 6, Jun, p.910-923. 2013.

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. **Immunol Lett**, v. 82, n. 1-2, Jun 3, p.149-154. 2002.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, May, p.734-747. 2012.

FRANCHI, L.; MUNOZ-PLANILLO, R.; NUNEZ, G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, Apr, p.325-332. 2012.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi. **Parasitol Today**, v. 16, n. 7, Jul, p.282-286. 2000.

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. **J Immunol**, v. 177, n. 1, Jul 1, p.216-226. 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**, v. 108, n. 2, Feb, p.230-237. 2003.

GARCIA-RAMALLO, E.; MARQUES, T.; PRATS, N.; BELETA, J.; KUNKEL, S. L.; GODESSART, N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. **J Immunol**, v. 169, n. 11, Dec 1, p.6467-6473. 2002.

GARIN, M. I.; CHU, C. C.; GOLSHAYAN, D.; CERNUDA-MOROLLON, E.; WAIT, R.; LECHLER, R. I. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. **Blood**, v. 109, n. 5, Mar 1, p.2058-2065. 2007.

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 an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 10, Oct, p.2501-2506. 1992.

GHOSN, E. E.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 6, Feb 9, p.2568-2573. 2010.

GILLIAM, M. B.; SHERMAN, M. P.; GRISCAVAGE, J. M.; IGNARRO, L. J. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by Aspergillus nitrate reductase. **Anal Biochem**, v. 212, n. 2, Aug 1, p.359-365. 1993.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, Dec, p.953-964. 2005.

GRAVINA, H. D.; ANTONELLI, L.; GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with Trypanosoma cruzi. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p.e63100. 2013.

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. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 2, Aug, p.152-158. 2001.

GUTIERREZ, F. R.; MARIANO, F. S.; OLIVEIRA, C. J.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, G. K.; CAMPANELLI, A. P.; MILANEZI, C. M.; AZUMA, M.; HONJO, T.; TEIXEIRA, M. M.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S. Regulation of Trypanosoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, May, p.1873-1881. 2011.

HE, J.; BAUM, L. G. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. **Lab Invest**, v. 86, n. 6, Jun, p.578-590. 2006.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, Oct 2, p.1191-1199. 1999.

HIGUCHI MDE, L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, v. 60, n. 1, Oct 15, p.96-107. 2003.

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 Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 423, n. 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. **Infect Immun**, v. 68, n. 1, Jan, p.197-204. 2000.

HOTEZ, P. J. Neglected infections of poverty in the United States of America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 6, p.e256. 2008.

HUANG, H.; CHAN, J.; WITTNER, M.; JELICKS, L. A.; MORRIS, S. A.; FACTOR, S. M.; WEISS, L. M.; BRAUNSTEIN, V. L.; BACCHI, C. J.; YARLETT, N.; CHANDRA, M.; SHIRANI, J.; TANOWITZ, H. B. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in Trypanosoma cruzi-infected mice. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 1, Jan, p.75-88. 1999.

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. **J Immunol**, v. 158, n. 7, Apr 1, p.3311-3316. 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. **Infect Immun**, v. 64, n. 7, Jul, p.2381-2386. 1996.

ILARREGUI, J. M.; CROCI, D. O.; BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; SALATINO, M.; VERMEULEN, M. E.; GEFFNER, J. R.; RABINOVICH, G. A. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. **Nat Immunol**, v. 10, n. 9, Sep, p.981-991. 2009.

INAGAKI, Y.; SOHMA, Y.; HORIE, H.; NOZAWA, R.; KADOYA, T. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 10, May, p.2955-2964. 2000.

ISHII, K. J.; KOYAMA, S.; NAKAGAWA, A.; COBAN, C.; AKIRA, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, Jun 12, p.352-363. 2008.

ISHIZUKA, E. K.; FERREIRA, M. J.; GRUND, L. Z.; COUTINHO, E. M.; KOMEGAE, E. N.; CASSADO, A. A.; BORTOLUCI, K. R.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Role of interplay between IL-4 and IFN-gamma in the in regulating M1 macrophage polarization induced by Nattectin. **Int Immunopharmacol**, v. 14, n. 4, Dec, p.513-522. 2012.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, Jan 15, p.291-295. 2010.

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; FENG, C. G.; GOLDSZMID, R. S.; COLLAZO, C. M.; WILSON, M.; WYNN, T. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; SHER, A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **J Exp Med**, v. 204, n. 2, Feb 19, p.273-283. 2007.

JOHNSON, C. A.; RACHAKONDA, G.; KLESHCHENKO, Y. Y.; NDE, P. N.; MADISON, M. N.; PRATAP, S.; CARDENAS, T. C.; TAYLOR, C.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Cellular response to Trypanosoma cruzi infection induces secretion of defensin alpha-1, which damages the flagellum, neutralizes trypanosome motility, and inhibits infection. **Infect Immun**, v. 81, n. 11, Nov, p.4139-4148. 2013.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 32, Aug 7, p.13134-13139. 2007.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Microbes Infect**, v. 12, n. 7, Jul, p.511-517. 2010.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, Sep 19, p.187-197. 2002.

KLESHCHENKO, Y. Y.; MOODY, T. N.; FURTAK, V. A.; OCHIENG, J.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Human galectin-3 promotes Trypanosoma cruzi adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infect Immun**, v. 72, n. 11, Nov, p.6717-6721. 2004.

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 177, n. 10, Nov 15, p.7059-7066. 2006.

KOHATSU, L.; HSU, D. K.; JEGALIAN, A. G.; LIU, F. T.; BAUM, L. G. Galectin-3 induces death of Candida species expressing specific beta-1,2-linked mannans. **J Immunol**, v. 177, n. 7, Oct 1, p.4718-4726. 2006.

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. **Am J Pathol**, v. 163, n. 4, Oct, p.1505-1515. 2003.

LAROUX, F. S.; ROMERO, X.; WETZLER, L.; ENGEL, P.; TERHORST, C. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. **J Immunol**, v. 175, n. 9, Nov 1, p.5596-5600. 2005.

LATTES, R.; LASALA, M. B. Chagas disease in the immunosuppressed patient. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 4, Apr, p.300-309. 2014.

LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p.433-440. 2004.

LEPPANEN, A.; STOWELL, S.; BLIXT, O.; CUMMINGS, R. D. Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. **J Biol Chem**, v. 280, n. 7, Feb 18, p.5549-5562. 2005.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, Jan, p.29-41. 2005.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1183, n., Jan, p.158-182. 2010.

LOHR, M.; LENSCH, M.; ANDRE, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H. C.; SMETANA, K., JR.; SINOWATZ, F.; GABIUS, H. J. Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1, -2 and -7: comparative profiling of gene/ promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistry. **Folia Biol (Praha)**, v. 53, n. 4, p.109-128. 2007.

LOPEZ-LUCENDO, M. F.; SOLIS, D.; ANDRE, S.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KALTNER, H.; GABIUS, H. J.; ROMERO, A. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **J Mol Biol**, v. 343, n. 4, Oct 29, p.957-970. 2004.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, May, p.145-151. 2008.

LUNA-GOMES, T.; FILARDY, A. A.; ROCHA, J. D.; DECOTE-RICARDO, D.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.; MORROT, A.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DOSREIS, G. A.; NUNES, M. P.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Neutrophils increase or reduce parasite burden in Trypanosoma cruzi-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p.e90582. 2014.

LYKENS, J. E.; TERRELL, C. E.; ZOLLER, E. E.; DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A.; KARP, C. L.; ALIBERTI, J.; FLICK, M. J.; JORDAN, M. B. 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. **J Immunol**, v. 184, n. 2, Jan 15, p.877-885. 2010.

MACHADO, F. C.; CRUZ, L.; DA SILVA, A. A.; CRUZ, M. C.; MORTARA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; DA SILVA, C. V. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of Trypanosoma cruzi extracellular amastigotes. **Glycobiology**, v. 24, n. 2, Feb, p.179-184. 2014.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol**, v. 23, n. 11, Nov, p.549-555. 2002.

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 Infect**, v. 10, n. 7, Jun, p.825-833. 2008.

MARTIN, D. L.; TARLETON, R. L. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 174, n. 3, Feb 1, p.1594-1601. 2005.

MARTIN, D. L.; WEATHERLY, D. B.; LAUCELLA, S. A.; CABINIAN, M. A.; CRIM, M. T.; SULLIVAN, S.; HEIGES, M.; CRAVEN, S. H.; ROSENBERG, C. S.; COLLINS, M. H.; SETTE, A.; POSTAN, M.; TARLETON, R. L. CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 8, Aug, p.e77. 2006.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. D.; RAMOS, A. N., JR.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Trop Med Int Health**, v., n., May 10. 2014.

MCGEACHY, M. J.; BAK-JENSEN, K. S.; CHEN, Y.; TATO, C. M.; BLUMENSCHEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, D. J. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nat Immunol**, v. 8, n. 12, Dec, p.1390-1397. 2007.

MELO, R. C. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by Trypanosoma cruzi infection. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 2, Feb, p.279-294. 2009.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. **J Parasitol**, v. 64, n. 3, Jun, p.475-482. 1978.

MELO, R. C.; FABRINO, D. L.; D'AVILA, H.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with Trypanosoma cruzi in vivo. **Cell Biol Int**, v. 27, n. 10, p.853-861. 2003.

MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. 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. **Am J Pathol**, v. 159, n. 5, Nov, p.1723-1733. 2001.

MISHRA, B. B.; LI, Q.; STEICHEN, A. L.; BINSTOCK, B. J.; METZGER, D. W.; TEALE, J. M.; SHARMA, J. Galectin-3 functions as an alarmin: pathogenic role for sepsis development in murine respiratory tularemia. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p.e59616. 2013.

MIURA, T.; TAKAHASHI, M.; HORIE, H.; KURUSHIMA, H.; TSUCHIMOTO, D.; SAKUMI, K.; NAKABEPPU, Y. Galectin-1beta, a natural monomeric form of galectin-1 lacking its six amino-terminal residues promotes axonal regeneration but not cell death. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 10, Oct, p.1076-1083. 2004.

MIYAZAKI, Y.; HAMANO, S.; WANG, S.; SHIMANOE, Y.; IWAKURA, Y.; YOSHIDA, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 185, n. 2, Jul 15, p.1150-1157. 2010.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann Trop Med Parasitol**, v. 100, n. 8, Dec, p.663-677. 2006.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that Trypanosoma cruzi uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Lett**, v. 470, n. 3, Mar 31, p.305-308. 2000.

MOREAU, A.; NOBLE, A.; RATNASOTHY, K.; CHAI, J. G.; DELTOUR, L.; CUTURI, M. C.; SIMPSON, E.; LECHLER, R.; LOMBARDI, G. Absence of Galectin-1 accelerates CD8(+) T cell-mediated graft rejection. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 11, Nov, p.2881-2888. 2012.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 11, Nov, p.6810-6814. 1980.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol**, v. 25, n. 2, Feb, p.75-84. 2004.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 2, Feb, p.209-212. 2003.

MUKHERJEE, S.; MACHADO, F. S.; HUANG, H.; OZ, H. S.; JELICKS, L. A.; PRADO, C. M.; KOBA, W.; FINE, E. J.; ZHAO, D.; FACTOR, S. M.; COLLADO, J. E.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; ASHTON, A. W. Aspirin treatment of mice infected with Trypanosoma cruzi and implications for the pathogenesis of Chagas disease. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p.e16959. 2011.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **J Immunol**, v. 160, n. 11, Jun 1, p.5347-5354. 1998.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, Mar, p.173-182. 2006.

NDE, P. N.; LIMA, M. F.; JOHNSON, C. A.; PRATAP, S.; VILLALTA, F. Regulation and use of the extracellular matrix by Trypanosoma cruzi during early infection. **Front Immunol**, v. 3, n., p.337. 2012.

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. **J Immunol**, v. 167, n. 10, Nov 15, p.5697-5707. 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**, v. 116, n. 2, Oct, p.233-244. 2005.

NORLING, L. V.; SAMPAIO, A. L.; COOPER, D.; PERRETTI, M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. **FASEB J**, v. 22, n. 3, Mar, p.682-690. 2008.

NOVAK, J.; KRISTON-PAL, E.; CZIBULA, A.; DEAK, M.; KOVACS, L.; MONOSTORI, E.; FAJKA-BOJA, R. GM1 controlled lateral segregation of tyrosine kinase Lck predispose T-cells to cell-derived galectin-1-induced apoptosis. **Mol Immunol**, v. 57, n. 2, Feb, p.302-309. 2014.

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. **J Neuroimmunol**, v. 28, n. 2, Jul, p.177-184. 1990.

OLIVEIRA, A. C.; DE ALENCAR, B. C.; TZELEPIS, F.; KLEZEWSKY, W.; DA SILVA, R. N.; NEVES, F. S.; CAVALCANTI, G. S.; BOSCARDIN, S.; NUNES, M. P.; SANTIAGO, M. F.; NOBREGA, A.; RODRIGUES, M. M.; BELLIO, M. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against Trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, Apr, p.e1000870. 2010.

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, J. R.; DE ARRUDA, L. B.; CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T.; AKIRA, S.; PREVIATO, J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; NOBREGA, A.; BELLIO, M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi. **J Immunol**, v. 173, n. 9, Nov 1, p.5688-5696. 2004.

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. **J Immunol**, v. 148, n. 11, Jun 1, p.3578-3582. 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. **J Immunol**, v. 163, n. 7, Oct 1, p.3801-3811. 1999.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 4, Aug, p.385-390. 2009.

PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z.; VICTORINO, V. J.; TATAKIHARA, V. L.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; CECCHINI, R.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, Jan, p.58-65. 2011.

PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R.; MARIANO, F. S.; PRADO, C. M.; FERREIRA, B. R.; TEIXEIRA, M. M.; CANETTI, C.; ROSSI, M. A.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection. **Microbes Infect**, v. 12, n. 8-9, Aug, p.587-597. 2010.

PELLETIER, I.; SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by Leishmania major through species-specific polygalactose epitope. **J Biol Chem**, v. 277, n. 20, May 17, p.17663-17670. 2002.

PEREZ, A. R.; SILVA-BARBOSA, S. D.; ROGGERO, E.; CALMON-HAMATY, F.; VILLAR, S. R.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, J. S.; SAVINO, W.; BOTTASSO, O. Immunoendocrinology of the thymus in Chagas disease. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 5, p.328-338. 2011.

PERILLO, N. L.; PACE, K. E.; SEILHAMER, J. J.; BAUM, L. G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, n. 6558, Dec 14, p.736-739. 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. **J Exp Med**, v. 185, n. 10, May 19, p.1851-1858. 1997.

PERLETH, M. The discovery of Chagas' disease and the formation of the early Chagas' disease concept. **Hist Philos Life Sci**, v. 19, n. 2, p.211-236. 1997.

PIACENZA, L.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; RADI, R. Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 4, Aug, p.415-421. 2009.

PRADO, C. M.; FINE, E. J.; KOBA, W.; ZHAO, D.; ROSSI, M. A.; TANOWITZ, H. B.; JELICKS, L. A. Micro-positron emission tomography in the evaluation of Trypanosoma cruzi-induced heart disease: Comparison with other modalities. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, n. 5, Nov, p.900-905. 2009.

RABINOVICH, G.; CASTAGNA, L.; LANDA, C.; RIERA, C. M.; SOTOMAYOR, C. Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 59, n. 3, Mar, p.363-370. 1996.

RABINOVICH, G. A.; ALONSO, C. R.; SOTOMAYOR, C. E.; DURAND, S.; BOCCO, J. L.; RIERA, C. M. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. **Cell Death Differ**, v. 7, n. 8, Aug, p.747-753. 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 proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. **Immunology**, v. 97, n. 1, May, p.100-106. 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 Immunol**, v. 23, n. 6, Jun, p.313-320. 2002.

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. **J Immunol**, v. 160, n. 10, May 15, p.4831-4840. 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 beta-galactoside-binding lectin. **J Biochem**, v. 122, n. 2, Aug, p.365-373. 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. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 5, May, p.1331-1339. 2000b.

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, May, p.338-352. 2009.

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. **J Immunol**, v. 153, n. 7, Oct 1, p.3135-3140. 1994.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A. C.; CALICH, V. L.; COUTINHO, S. G.; LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection. **J Immunol**, v. 172, n. 7, Apr 1, p.4454-4462. 2004.

ROCHA RODRIGUES, D. B.; DOS REIS, M. A.; ROMANO, A.; PEREIRA, S. A.; TEIXEIRA VDE, P.; TOSTES, S., JR.; RODRIGUES, V., JR. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, n., p.361730. 2012.

ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G.; BESTETTI, R. B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. **Front Biosci**, v. 8, n., Jan 1, p.e94-109. 2003.

ROSTOKER, R.; YASEEN, H.; SCHIF-ZUCK, S.; LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A.; ARIEL, A. Galectin-1 induces 12/15-lipoxygenase expression in murine macrophages and favors their conversion toward a pro-resolving phenotype. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 107, n., Dec, p.85-94. 2013.

RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. **Trends Immunol**, v. 28, n. 10, Oct, p.429-436. 2007.

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

SANOJA, C.; CARBAJOSA, S.; FRESNO, M.; GIRONES, N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental Trypanosoma cruzi infection. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p.e65820. 2013.

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. **J Interferon Cytokine Res**, v. 26, n. 9, Sep, p.682-688. 2006.

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**, v. 31, n. 2, Feb, p.399-406. 2000.

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

SARTER, K.; ANDRE, S.; KALTNER, H.; LENSCH, M.; SCHULZE, C.; URBONAVICIUTE, V.; SCHETT, G.; HERRMANN, M.; GABIUS, H. J. Detection and chromatographic removal of lipopolysaccharide in preparations of multifunctional galectins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 379, n. 1, Jan 30, p.155-159. 2009.

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

SATO, S.; ST-PIERRE, C.; BHAUMIK, P.; NIEMINEN, J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunol Rev**, v. 230, n. 1, Jul, p.172-187. 2009.

SCHEEL-TOELLNER, D.; WANG, K.; CRADDOCK, R.; WEBB, P. R.; MCGETTRICK, H. M.; ASSI, L. K.; PARKES, N.; CLOUGH, L. E.; GULBINS, E.; SALMON, M.; LORD, J. M. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. **Blood**, v. 104, n. 8, Oct 15, p.2557-2564. 2004.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M. S.; HART, G. W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, n. 7, Jun 28, p.1117-1125. 1991.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem Sci**, v. 18, n. 6, Jun, p.221-226. 1993.

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

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci**, v. 8, n., May 1, p.s314-325. 2003.

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. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, Jan 1, p.169-174. 1992.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med**, v. 174, n. 3, Sep 1, p.539-545. 1991.

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. **Infect Immun**, v. 63, n. 12, Dec, p.4862-4867. 1995.

STAROSSOM, S. C.; MASCANFRONI, I. D.; IMITOLA, J.; CAO, L.; RADDASSI, K.; HERNANDEZ, S. F.; BASSIL, R.; CROCI, D. O.; CERLIANI, J. P.; DELACOUR, D.; WANG, Y.; ELYAMAN, W.; KHOURY, S. J.; RABINOVICH, G. A. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. **Immunity**, v. 37, n. 2, Aug 24, p.249-263. 2012.

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

STOWELL, S. R.; ARTHUR, C. M.; MCBRIDE, R.; BERGER, O.; RAZI, N.; HEIMBURG-MOLINARO, J.; RODRIGUES, L. C.; GOURDINE, J. P.; NOLL, A. J.; VON GUNTEN, S.; SMITH, D. F.; KNIREL, Y. A.; PAULSON, J. C.; CUMMINGS, R. D. Microbial glycan microarrays define key features of host-microbial interactions. **Nat Chem Biol**, v. 10, n. 6, Jun, p.470-476. 2014.

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**, v. 14, n. 2, Feb, p.157-167. 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**, v. 109, n. 1, Jan 1, p.219-227. 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. **J Immunol**, v. 180, n. 5, Mar 1, p.3091-3102. 2008.

SURYAWANSHI, A.; CAO, Z.; THITIPRASERT, T.; ZAIDI, T. S.; PANJWANI, N. Galectin-1-mediated suppression of Pseudomonas aeruginosa-induced corneal immunopathology. **J Immunol**, v. 190, n. 12, Jun 15, p.6397-6409. 2013.

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. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, Aug, p.4247-4253. 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 Infect**, v. 2, n. 8, Jul, p.851-866. 2000.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, n. 4, Oct, p.400-419. 1992.

TANOWITZ, H. B.; MACHADO, F. S.; JELICKS, L. A.; SHIRANI, J.; DE CARVALHO, A. C.; SPRAY, D. C.; FACTOR, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; WEISS, L. M. Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease). **Prog Cardiovasc Dis**, v. 51, n. 6, May-Jun, p.524-539. 2009.

TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 144, n. 2, Jan 15, p.717-724. 1990.

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. **Nat Immunol**, v. 8, n. 8, Aug, p.825-834. 2007.

TOSCANO, M. A.; CAMPAGNA, L.; MOLINERO, L. L.; CERLIANI, J. P.; CROCI, D. O.; ILARREGUI, J. M.; FUERTES, M. B.; NOJEK, I. M.; FEDEDA, J. P.; ZWIRNER, N. W.; COSTAS, M. A.; RABINOVICH, G. A. Nuclear factor (NF)-kappaB controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. **Mol Immunol**, v. 48, n. 15-16, Sep, p.1940-1949. 2011.

TOSCANO, M. A.; COMMODARO, A. G.; ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; LIBERMAN, A.; SERRA, H. M.; HIRABAYASHI, J.; RIZZO, L. V.; RABINOVICH, G. A. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **J Immunol**, v. 176, n. 10, May 15, p.6323-6332. 2006.

TOSELLO BOARI, J.; AMEZCUA VESELY, M. C.; BERMEJO, D. A.; RAMELLO, M. C.; MONTES, C. L.; CEJAS, H.; GRUPPI, A.; ACOSTA RODRIGUEZ, E. V. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p.e1002658. 2012.

TRISCHMANN, T. M. Trypanosoma cruzi: early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. **Exp Parasitol**, v. 62, n. 2, Oct, p.194-201. 1986.

TROCOLI TORRECILHAS, A. C.; TONELLI, R. R.; PAVANELLI, W. R.; DA SILVA, J. S.; SCHUMACHER, R. I.; DE SOUZA, W.; NC, E. S.; 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 Infect**, v. 11, n. 1, Jan, p.29-39. 2009.

TURNER, C. W.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Trypanosoma cruzi uses a 45-kDa mucin for adhesion to mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 290, n. 1, Jan 11, p.29-34. 2002.

TZELEPIS, F.; DE ALENCAR, B. C.; PENIDO, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; PERSECHINI, P. M.; RODRIGUES, M. M. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with Trypanosoma cruzi in naive or vaccinated mice. **Infect Immun**, v. 74, n. 4, Apr, p.2477-2481. 2006.

UNE, C.; ANDERSSON, J.; ORN, A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with Trypanosoma cruzi. **Clin Exp Immunol**, v. 134, n. 2, Nov, p.195-201. 2003.

VAN CROMBRUGGEN, K.; JACOB, F.; ZHANG, N.; BACHERT, C. Damage-associated molecular patterns and their receptors in upper airway pathologies. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 22, Nov, p.4307-4321. 2013.

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. **J Pathol**, v. 204, n. 5, Dec, p.511-518. 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. **Mol Immunol**, v. 44, n. 4, Jan, p.506-513. 2007.

VARKI, A.; ETZLER, M. E.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. ETZLER, M. E. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY), 2nd ed., 2009

VARKI, A.; SHARON, N. Historical Background and Overview. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. ETZLER, M. E. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY), 2nd ed., 2009

VASCONCELOS, J. R.; DOMINGUEZ, M. R.; NEVES, R. L.; ERSCHING, J.; ARAUJO, A.; SANTOS, L. I.; VIRGILIO, F. S.; MACHADO, A. V.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; RODRIGUES, M. M. Adenovirus vector-induced CD8(+) T effector memory cell differentiation and recirculation, but not proliferation, are important for protective immunity against experimental Trypanosoma cruzi Infection. **Hum Gene Ther**, v. 25, n. 4, Apr, p.350-363. 2014.

VASTA, G. R.; AHMED, H.; NITA-LAZAR, M.; BANERJEE, A.; PASEK, M.; SHRIDHAR, S.; GUHA, P.; FERNANDEZ-ROBLEDO, J. A. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. **Front Immunol**, v. 3, n., p.199. 2012.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, Nov, p.5177-5182. 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. **J Immunol**, v. 162, n. 2, Jan 15, p.799-806. 1999.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigote) forms of

Trypanosoma cruzi by human neutrophils. **J Immunol**, v. 131, n. 3, Sep, p.1504-1510. 1983.

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; PRATAP, S.; BURNS, J. M., JR.; LIMA, M. F. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of Trypanosoma cruzi: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. **Mol Cell Biol Res Commun**, v. 2, n. 1, Jul, p.64-70. 1999.

VILLARINO, N.; SCHMIDT, N. W. CD8 T Cell Responses to and Intracellular Parasites. **Curr Immunol Rev**, v. 9, n. 3, Aug, p.169-178. 2013.

WANG, L.; FRIESS, H.; ZHU, Z.; FRIGERI, L.; ZIMMERMANN, A.; KORC, M.; BERBERAT, P. O.; BUCHLER, M. W. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. **Lab Invest**, v. 80, n. 8, Aug, p.1233-1241. 2000.

WEST, A. P.; BRODSKY, I. E.; RAHNER, C.; WOO, D. K.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; WALSH, M. C.; CHOI, Y.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 472, n. 7344, Apr 28, p.476-480. 2011.

WHITNEY, P. L.; POWELL, J. T.; SANFORD, G. L. Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. **Biochem J**, v. 238, n. 3, Sep 15, p.683-689. 1986.

WIZEL, B.; PALMIERI, M.; MENDOZA, C.; ARANA, B.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; TARLETON, R. Human infection with Trypanosoma cruzi induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. **J Clin Invest**, v. 102, n. 5, Sep 1, p.1062-1071. 1998.

YAMANISHI, T.; HATAKEYAMA, T.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. CEL-I, an N-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific C-type lectin, induces nitric oxide production in RAW264.7 mouse macrophage cell line. **J Biochem**, v. 146, n. 2, Aug, p.209-217. 2009.

ZHOU, L.; IVANOV, II; SPOLSKI, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY, D. E.; LEONARD, W. J.; LITTMAN, D. R. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, Sep, p.967-974. 2007.

ZUNIGA, 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. **Infect Immun**, v. 69, n. 11, Nov, p.6804-6812. 2001a.

ZUNIGA, E.; RABINOVICH, G. A.; IGLESIAS, M. M.; GRUPPI, A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 1, Jul, p.73-79. 2001b.

ChemPubSoc Europe

DOI: 10.1002/cbic.201400069

Antibodies against Mucin-Based Glycopeptides Affect *Trypanosoma cruzi* Cell Invasion and Tumor Cell Viability

Vanessa L. Campo, Thalita B. Riul, Ivone Carvalho,* and Marcelo-Dias Baruffi*[a]

This study describes the synthesis of glycopeptides NHAc-[βGal]-$(Thr)_2$-[αGalNAc]-$(Thr)_2$-[αGlcNAc]-$(Thr)_2$Gly-OVA (**1**-OVA) and NHAc[βGal-αGalNAc]-$(Thr)_3$-[αLacNAc]-$(Thr)_3$-Gly-OVA (**2**-OVA) as mimetics of both *T. cruzi* and tumor mucin glycoproteins. These glycopeptides were obtained by solid-phase synthesis, which involved the prior preparation of the protected glycosyl amino acids αGlcNAc-ThrOH (**3**), αGalNAc-ThrOH (**4**), βGal-ThrOH (**5**), αLacNAc-ThrOH (**6**), and βGal-αGalNAc-ThrOH (**7**) through glycosylation reactions. Immunizations of mice with glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA induced high antibody titers (1/16 000■■1:16 000?■■), as verified by ELISA tests, whereas flow cytometry assays showed the capacity of the obtained anti-glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA antibodies■■obtained antibodies to glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA?■■ to recognize both *T. cruzi* and MCF-7 tumor cells. In addition, antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ were also able to inhibit *T. cruzi* fibroblast cell invasion (70%) and to induce antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC) against MCF-7 cells, with 50% reduction of cell viability.

1. Introduction

Mucins are heavily *O*-glycosylated (about 60% carbohydrate by weight) high-molecular-weight glycoproteins, containing typical tandem repeat motifs rich in serine and threonine residues. They can be either secreted or attached to the cell surfaces of many epithelial tissues—respiratory mucosa, reproductive system, and gastrointestinal tract, among others—where they perform essential roles of protection, hydration, and lubrication. Additionally, apart from these primary functions, mucins are also involved in complex biological processes such as cell differentiation, signaling transduction regulation, cell adhesion, fertilization, infections, inflammation, carcinogenesis, and cancer metastasis.[1–3]

Mucins found in *Trypanosoma cruzi*, the parasite responsible for Chagas disease, show some striking differences from those found in mammalian systems. These mainly relate to the peptide glycosylation pattern, in which the threonine or serine residues are *O*-linked to α-*N*-acetylglucosamine (αGlcNAc) units, further substituted by galactose (Gal) at the O-4 and O-6 positions (Scheme 1A), rather than to α-*N*-acetylgalactosamine (αGalNAc) substituted by Gal at the O-3 and O-6 positions as found in mammalian mucins.[3–6] This αGlcNAc-Ser/Thr core is not expressed in humans, so it might represent a crucial immunogen that could be explored for further immunotherapeutic/diagnostic strategies.[7]

Mucin biosynthesis is based on a sequential enzymatic process initially involving either (in mammals) UDP-GalNAc:polypeptide-*N*-acetyl-galactosaminyltransferase (ppGalNAc-T), which adds an αGalNAc unit (synthesis of Tn antigen), or (in the parasite) UDP-GlcNAc:polypeptide-*N*-acetyl-glucosaminyltransferase (ppGlcNAc-T), which normally adds an αGlcNAc unit to the parasite mucin. The significance of *T. cruzi* mucins during infection lies in the ability of the β-galactopyranosyl core to accept sialic acid units from host sialylglycoconjugates to form α-2,3-linked sialylated β-galactopyranose glycosides on the *T. cruzi* surface through the action of the parasite surface *trans*-sialidase enzyme (TcTS). Besides being involved in the attachment of the parasite onto host cells and its subsequent penetration into them, the sialylated mucins are also able to mask the presence of the parasite from the host immune response, conferring resistance to complement■■its complement? meaning unclear.■■ and protect against antibody-mediated lysis.[4,7,8]

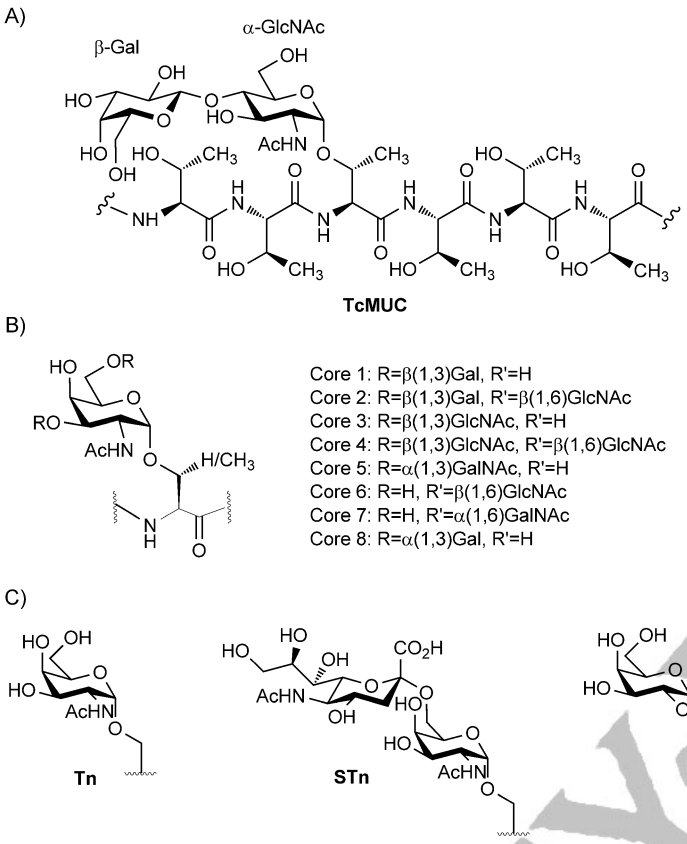
In general, mammalian mucins are based on conserved patterns, consisting of eight different combinations that have already been identified: cores 1 to 8 (Scheme 1B).[1,9] However, in instances of occurrence of abnormal biosynthetic processes or deregulated metabolism, altered mucin glycosylation processes are often associated with inflammatory response and several types of cancer; this is reflected in the way that certain classes of mucins, such as MUC1, MUC4, and MUC16, are employed as tumor markers of clinical relevance.[2,10] MUC1 is the most extensively studied, because it is present on nearly all epithelial tissues, being strongly overexpressed on epithelial tumor cells, where it is characteristically changed in relation to the glycan profile of MUC1 on normal cells, particularly, in the

[a] Dr. V. L. Campo, T. B. Riul, Prof. Dr. I. Carvalho,[+] Prof. Dr. M.-D. Baruffi[+]
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP
Av. Café S/N, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP (Brazil)
E-mail: carronal@usp.br
mdbaruff@fcfrp.usp.br

[+] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201400069: experimental description of the glycosyl amino acids **3**, **4**, **5**, and **6**, as well as their intermediate precursors, ^{1}H NMR and ESI-MS/MALDI-TOF analyses of the main compounds, and complementary figures related to the biological assays.

© WILEY-VCH Gallery proofs



Scheme 1. Formulas of mucin *O*-glycoproteins. A) Representation of *T. cruzi* mucin glycoprotein (TcMUC). B) General formulas (cores 1–8) of *O*-glycans in mucins. C) Tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs).

extracellular domain.[11,12] A variable number (25–125) of tandem repeat sequences (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA), each containing five potential O-glycosylation sites (T4, S5, T9, S15, and T16), can be observed, with the immunodominant epitope being represented by the glycosylated peptide motif PDTRPAP ■■ok?■■.[12,13] Accordingly, truncated *O*-GalNAc glycans including Tn (αGalNAcSer/Thr), STn (Siaα2–6αGalNAcSer/Thr), and Thomsen–Friedenreich (TF or T-antigen, Galβ1–3αGalNAcSer/Thr) antigens are found exposed on tumor cells (Scheme 1 C), in which their aberrant and abundant expression confers on them the classification of tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs), with functional properties of adhesion, invasion, and metastasis.[1,10,14–24] As can be seen in recent literature, the involvement of TACA structures in inducing active immunity and their limited occurrence in normal tissues make them valuable targets for immunotherapy against cancer.[20–23]

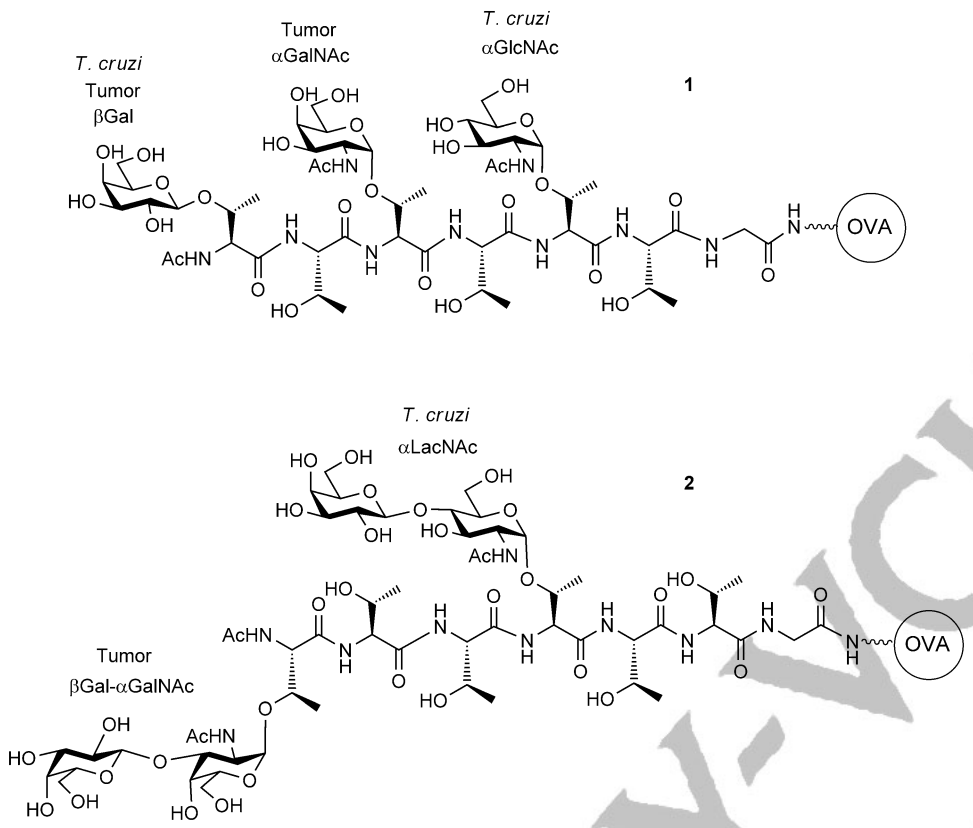
Although most *T. cruzi O*-glycans are linked to Ser/Thr residues of the protein core through α-*N*-acetylglucosamine, recent evidence has shown that tumor-associated antigens such as Tn and sialyl-Tn are also expressed by *T. cruzi*.[10,25] According to in vitro assays, the activity of the ppGalNAc-T enzyme was detectable in parasite lysates through the transfer of GalNAc from UDP-GalNAc to a synthetic peptide (KPTTTTTTTTPK) derived from *T. cruzi* mucin. However, it is still not established whether the incorporation of α-GalNAc is due to the specific ppGalNAc-T enzyme or if it is a reaction catalyzed by the same parallel glycosyltransferase (ppGlcNAc-T). In addition, the presence of the sialyl-Tn antigen in *T. cruzi* epimastigotes was confirmed by immunological assays based on the anti-sialyl-Tn monoclonal antibody (MAb B72.3), thus prompting speculation about the existence of a variant *trans*-sialidase able to transfer sialic acid to α-GalNAc residues.[25]

All these features suggest that the tumor-associated antigens Tn and sialyl-Tn in *T. cruzi* mucin glycoproteins might be immunogenic in *T. cruzi* infection.[26,27] In fact, chronically infected mice that were treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH), a substance known for its ability to induce colon cancer (in which Tn and STn antigens are expressed), had lower rates of malignancy than animals that were exposed to DMH but had had no previous contact with the parasite. Thus, *T. cruzi* infection might induce a cross-reactive immune response against the tumor antigens that were previously expressed on *T. cruzi*.[26] Presumably, if parasites and tumors share similar antigens, the production of antibodies against the parasite should also elicit an effective cross-immunity against cancer cells, turning this association into an important model for immunotherapeutic studies.[10]

Because there is no effective drug against *T. cruzi* (benznidazole and nifurtimox act only in the acute phase of the infection and cause severe side effects),[28–30] the search for new therapeutic strategies is crucial. An anti-*T. cruzi* DNA vaccine encoding the antigens Tc24 (trypomastigote excretory-secretory protein) and TSA-1 (*T. cruzi* trypomastigote *trans*-sialidase), for instance, is currently being developed, but there is a lack of preclinical and clinical tests necessary to validate it as an effective human vaccine, though it has shown reductions in parasitemia and specific antiparasitic T-cell immunity.[31,32]

On the basis of these findings, we postulated that the molecular mimicking of correlated *T. cruzi* and tumor mucins might represent a frontline for the development of new immunotherapeutic/diagnostic strategies targeted against both *T. cruzi* infection and tumors. Therefore, in this paper we describe the synthesis of threonine-derived glycopeptides conjugated to the ovalbumin (OVA) carrier protein—NHAc[βGal]-$(Thr)_2$-[αGalNAc]-$(Thr)_2$-[αGlcNAc]-$(Thr)_2$Gly-OVA (**1**-OVA) and NHAc[βGal-αGalNAc]-$(Thr)_3$-[αLacNAc]-$(Thr)_3$-Gly-OVA (**2**-OVA, Scheme 2)—as mimetics of both *T. cruzi* and tumor mucin gly-

© WILEY-VCH Galley Proof



Scheme 2. Chemical formulas of glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA—mimetics of both *T. cruzi* and tumor mucins.

coproteins. Accordingly, glycopeptide **1**-OVA contains αGlcNAc and αGalNAc sugar units related to *T. cruzi* and tumor mucins, respectively, together with the βGal unit present in both mucins, whereas glycopeptide **2**-OVA incorporates the corresponding *T. cruzi*- and tumor-related disaccharides αLacNAc and βGal-αGalNAc (TF). Biological assays involving polyclonal antibody production in mice, flow cytometry analysis, *T. cruzi* cell invasion inhibition, and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) are also reported.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis

The target glycopeptides NHAc[βGal]-$(Thr)_2$-[αGalNAc]-$(Thr)_2$-[αGlcNAc]-$(Thr)_2$Gly-OVA (**1**-OVA) and NHAc[βGal-αGalNAc]-$(Thr)_3$-[αLacNAc]-$(Thr)_3$-Gly-OVA (**2**-OVA) were obtained by solid-phase synthesis, which involved the prior preparation of protected glycosyl amino acids αGlcNAc-ThrOH (**3**, Scheme 3, αGalNAc-ThrOH (Tn, **4**), βGal-ThrOH (**5**), αLacNAc-ThrOH (**6**), and βGal-αGalNAc-ThrOH (TF, **7**) as building blocks for obtaining the fundamental scaffolds of *T. cruzi* and tumor mucins.

2.1.1. Synthesis of glycosyl amino acids: We have previously reported on the use of $HgBr_2$ as an effective glycosylation catalyst for the synthesis of related Ser/Thr glycosyl amino acids containing the distinct α/βGlcNAc, α/βGalNAc, or αLacNAc cores.[33–35] $HgBr_2$-catalyzed glycosylations utilizing N_3-derived (C-2 non-participating group) and NHAc-derived (C-2 participating group) glycosyl donors afforded, in most cases, the expected α-glycosides (1,2-*cis*) and β-glycosides (1,2-*trans*)■■ok?■■, respectively, as major products, as well as small amounts of the corresponding unexpected β- and α-glycosides (which represents a broadening of the potential application of $HgBr_2$).

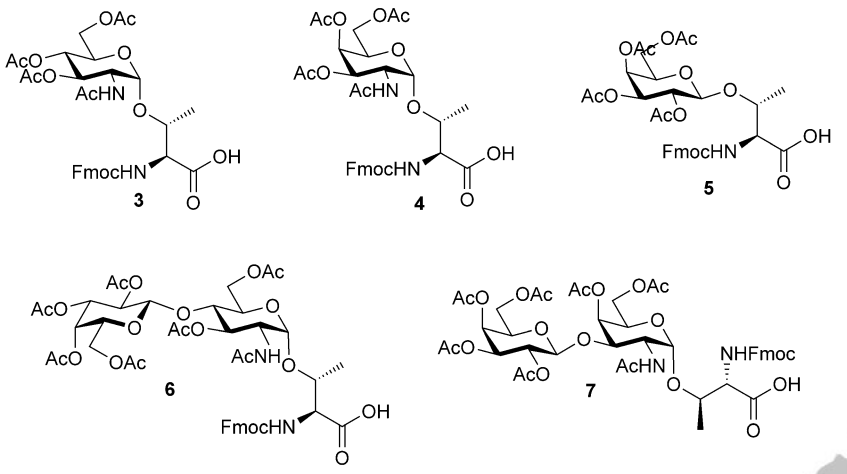
Therefore, for the synthesis of glycosyl amino acids αGlcNAc-ThrOH (**3**), αGalNAc-ThrOH (Tn, **4**), and αLacNAc-ThrOH (**6**, Scheme 3, Scheme S1 in the Supporting Information) we made use of this established $HgBr_2$-based glycosylation method. Glycosylation of FmocThr benzyl ester (**8**) with the glycosyl donor αGlcNAcCl (**9**)[36] gave the β isomer βGlcNAc-ThrOBn (**10**) in 50% yield, accompanied by the corresponding α isomer αGlcNAc-ThrOBn (**11**) in a lower 20% yield, as expected.[33] The focus of this study, however, was exclusively on the α isomer αGlcNAc-ThrOH (**3**), so the azido-derived glycosyl donor αGlcN_3Cl (**12**) was preferentially used in a glycosylation reaction with **8** under the same conditions, affording the desired αGlcN_3-ThrOBn (**13**) in 45% yield, along with its corresponding β isomer βGlcN_3-ThrOBn (**14**) in a lower 11% yield.

For the glycosyl amino acids αGalNAc-ThrOH (**4**) and αLacNAc-ThrOH (**6**), unlike in the case of αGlcN_3-ThrOBn (**13**), glycosylation reactions of FmocThr benzyl ester (**8**) with the corresponding azido-derived glycosyl donors αGalN_3Cl (**15**) and αLacN_3Cl (**16**)[37,38] afforded exclusively the α isomers αGalN_3-ThrOBn (**17**, 54%) and αLacN_3-ThrOBn (**18**, 60%), respectively.[33,35] The ^{1}H NMR spectra of **13**, **17**, and **18** showed characteristic doublet signals for H-1 with $J_{1,2}=3.6$–3.7 Hz, thus confirming their α configurations.

Subsequently, the sugar azido groups of the described intermediates were reductively acetylated (zinc powder in THF/acetic anhydride/acetic acid),[39] to give αGlcNAc-ThrOBn (**11**, 80%), αGalNAc-ThrOBn (**19**, 62%), and αLacNAc-ThrOBn (**20**, 65%), and benzyl ester groups were removed by standard hydrogenolysis (10% Pd-C/H_2, 1 h), to afford the products αGlcNAc-ThrOH (**3**, 100%), αGalNAc-ThrOH (**4**, 90%), and αLacNAc-ThrOH (**6**, 60%).[33]

The synthesis of the glycosyl amino acid βGal-ThrOH (**5**, Scheme 3) was achieved by glycosylation of FmocThr benzyl ester (**8**) with αGalBr (**21**), with iodine as the catalyst and acetonitrile as the solvent,[40,41] leading exclusively to the β isomer βGal-ThrOBn (**22**) in 27% yield, as confirmed by ^{1}H NMR spec-

WILEY-VCH Galley proof

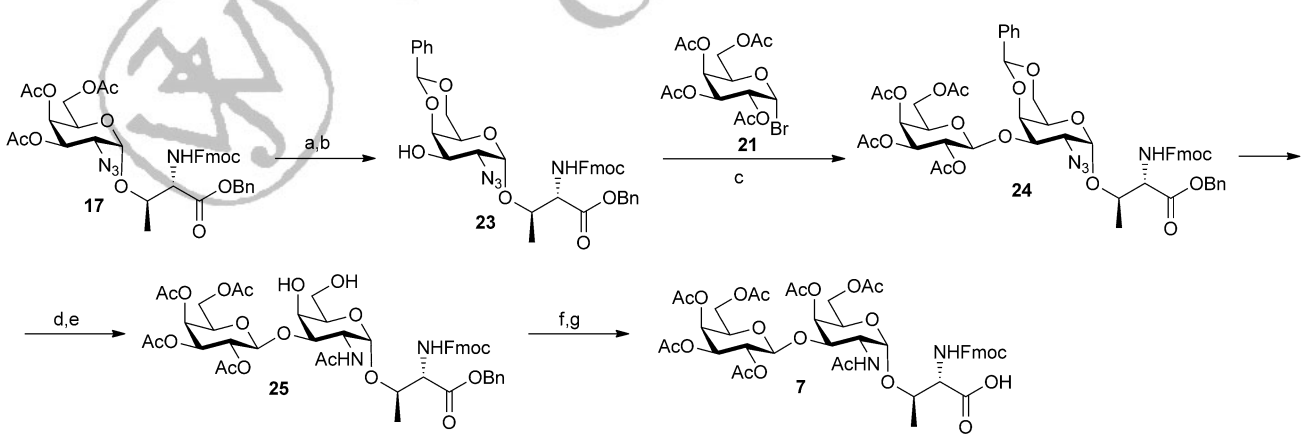


Scheme 3. Chemical formulas of protected glycosyl amino acids αGlcNAc-ThrOH (**3**), αGalNAc-ThrOH (Tn, **4**), βGal-ThrOH (**5**), αLacNAc-ThrOH (**6**), and βGal-αGalNAc-ThrOH (TF, **7**).

troscopy (H-1, $J_{1,2}=7.6$ Hz). Subsequent hydrogenolysis (10% Pd-C/H_2, 1 h) of **22** gave βGal-ThrOH (**5**) in quantitative yield.

The glycosyl amino acid βGal-αGalNAc-ThrOH (TF, **7**, Scheme 3) can be obtained either by prior preparation of the disaccharide fragment (βGal-αGalNAc) followed by coupling with Thr or by initial glycosylation between αGalNAc and Thr, with subsequent attachment to βGal, the two procedures being equally well described.[1,42,43] We made use of the second approach, because we had previously synthesized the glycosyl amino acid αGalN_3-ThrOBn (**17**, Scheme 4), and carried out the synthesis of **7** from its precursor **17** under conditions slightly different from those previously reported, especially with regard to the glycosylation catalysts.[1,42,43] Deacetylation of αGalN_3-ThrOBn (**17**) with hydrazine monohydrate, followed by treatment with benzaldehyde dimethyl acetal, gave compound **23** (60%),[44] and the ^{1}H NMR spectrum showed a singlet at 5.54 ppm corresponding to C*H*Ph. The subsequent synthesis of the disaccharyl amino acid **24** was conducted by glycosylation of **23** with the glycosyl donor αGalBr (**21**, Scheme 4) in the presence of different promoters to form **24**. Iodine, for instance, completely failed to produce the disaccharide, with the acceptor being recovered along with the hemiacetal formed from bromide **21**. Thus, considering the known efficiency of silver salts in assisting displacement of leaving groups by complexation with anomeric halides,[45–47] the use of the catalytic systems $AgClO_4/Ag_2CO_3$ and AgOTf[48–50] as alternative promoters to the reported NIS/TfOH, TMSOTf, and $Hg(CN)_2$[1,42,43] was pursued. In the first case, **24** was isolated as a mixture with the acceptor, being obtained in very low yield (12%). Conversely, glycosylation in the presence of AgOTf gave **24** in respectable yield (61%) after a 1 h reaction time. The ^{1}H NMR spectrum of **24** showed a doublet for H-1′ (4.77 ppm, $J_{1,2}=7.9$ Hz), characteristic of a β-linkage. Finally, cleavage of the benzylidene protecting group of **24** in the presence of 80% aqueous AcOH at 70 °C, followed by reductive acetylation of the azido group,[39] as described for compounds **13**, **17**, and **18**, gave βGal-αGalNAc-ThrOBn (**25**, 88%), which was successively subjected to acetylation (pyridine/acetic anhydride) and hydrogenolysis (10% Pd-C/H_2, 1 h) to produce the final **7** in 80% yield (Scheme 4).

*2.1.2. Solid-phase synthesis of glycopeptides **1** and **2***: For glycopeptides **1** and **2**, mimetics of both *T. cruzi* and tumor mucins, solid-phase glycopeptide synthesis (SPPS) was performed by using commercial Wang resin pre-loaded with Fmoc-Gly (0.65 mmol g^{-1} resin) as the solid support and an orthogonal Fmoc-based SPPS approach.[51] Thus, after removal of *N*-Fmoc groups with 20% piperidine in DMF, the amino acid building blocks were coupled in the presence of the coupling reagents PyBOP/HOBt and *N*,*N*-diisopropylethylamine (DIPEA), in DMF. Optimal coupling times ranged from 6 h to 24 h for the incorporation of Fmoc-ThrOH, depending on the preceding peptide sequence. For incorporation of the more sterically and



Scheme 4. Synthesis of glycosyl amino acid βGal-αGalNAc-ThrOH (**7**). a) H_2NNH_2/MeOH; b) $PhCH(OMe)_2$/TsOH, DMF; c) AgOTf, CH_2Cl_2, −25 °C; d) 80% AcOH; e) Zn, $CuSO_4$, Ac_2O/AcOH/THF; f) Py/Ac_2O; g) H_2/Pd-C 10%.

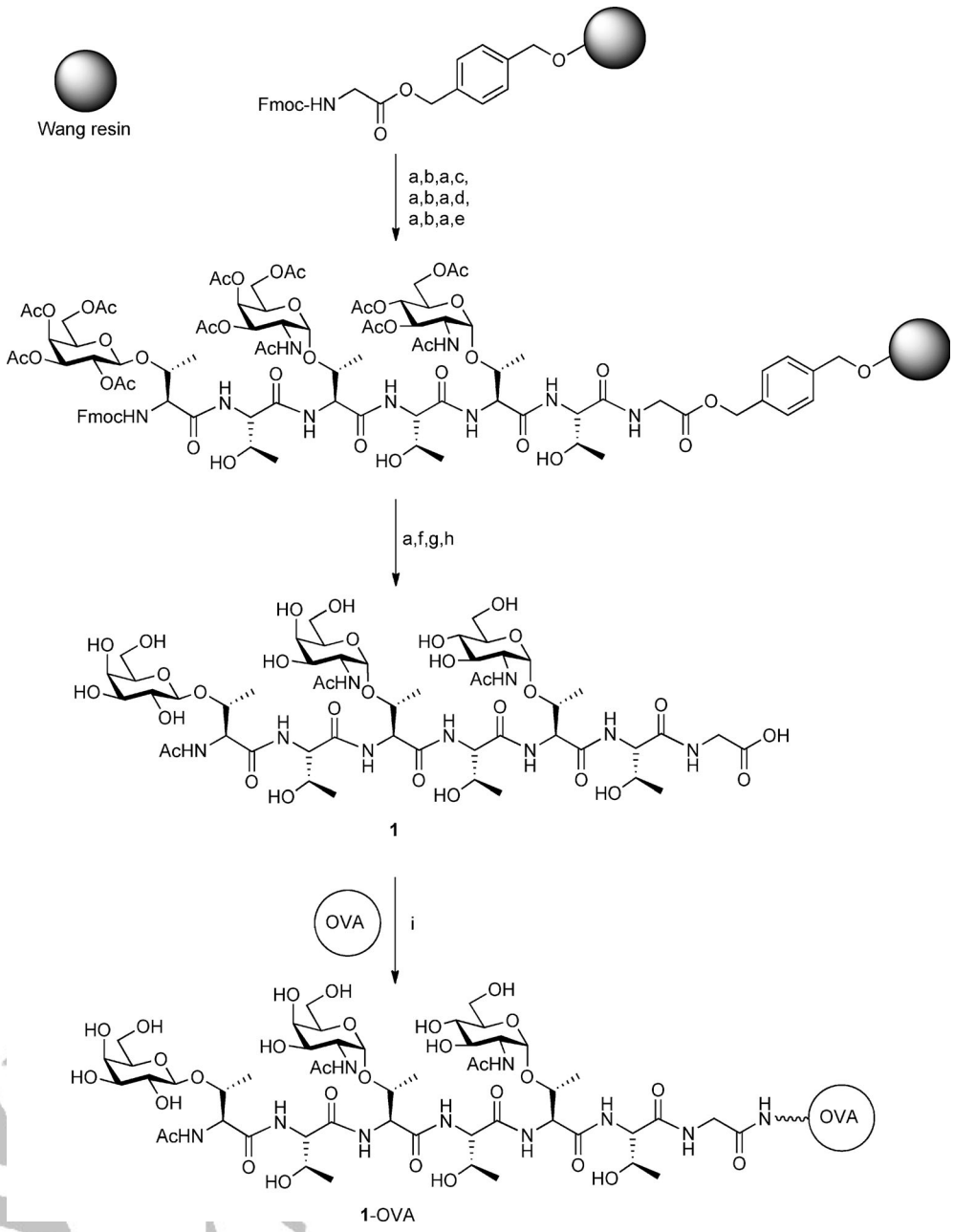
© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

electronically demanding glycosyl amino acids **3**–**7** the coupling times typically ranged from 24 h to 72 h.

The synthesis of glycopeptide **1** was initiated by cleavage of the Fmoc group from Fmoc-Gly-Wang resin, followed by six rounds of coupling/deprotection with sequential incorporation of Fmoc-ThrOH, αGlcNAc-ThrOH (**3**), Fmoc-ThrOH, αGalNAc-ThrOH (**4**), Fmoc-ThrOH and βGal-ThrOH (**5**), thus completing the preparation of the protected, resin-bound glycopeptide **1** (Scheme 5). The obtained peptide coupling efficiencies, as judged by measuring dibenzofulvene released from the products, varied with the position in the peptide chain: 90% in the case of Thr1, 60% in that of αGlcNAc-ThrOH (**3**), 65% for Thr2, 52% for αGalNAc-ThrOH (**4**), 70% for Thr3, and 50% for βGal-ThrOH (**5**).[33,51]

In a similar manner, glycopeptide **2** was synthesized (Scheme 6) in six rounds of coupling/deprotection with sequential addition of Fmoc-ThrOH (2×), αLacNAc-ThrOH (**6**), Fmoc-ThrOH (2×), and βGal-αGalNAc-ThrOH (**7**). The peptide coupling efficiencies obtained varied with the position in the peptide chain: 90% in the case of Thr1, 80% in that of Thr2, 52% for αLacNAc-ThrOH (**6**), 55% for Thr3, 60% for Thr4, and 50% for βGal-αGalNAc-ThrOH (**7**).

Cleavage from the resin with aqueous TFA, followed by *N*-acetylation with pyridine and acetic anhydride for capping of terminal NH_2 and removal of the sugar acetate protecting groups with catalytic NaOMe in MeOH, gave crude glycopeptides **1** and **2**, which were then purified by gel filtration chromatography, being obtained in 16 and 12% overall yield, respectively.

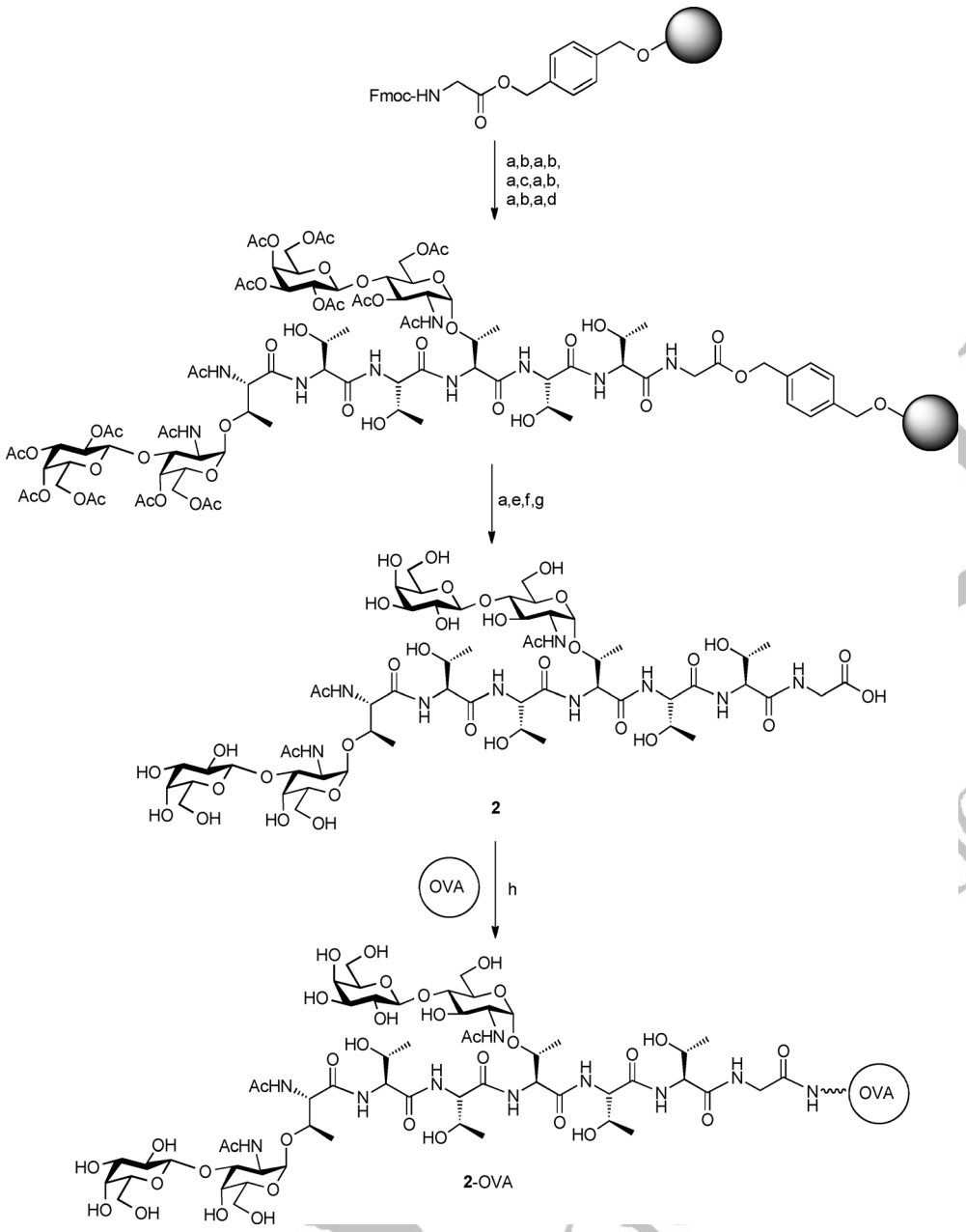


Scheme 5. Solid-phase synthesis of glycopeptide **1**. a) 20% piperidine in DMF; b) FmocThrOH, PyBOP, HOBt, DIPEA; c) αGlcNAc-ThrOH (**3**), PyBOP, HOBt, DIPEA; d) αGalNAc-ThrOH (**4**), PyBOP, HOBt, DIPEA; e) βGal-ThrOH (**5**), PyBOP, HOBt, DIPEA; f) TFA 95%; g) pyridine/acetic anhydride; h) NaOMe, MeOH; i) EDCI, NHS, Na_2HPO_4.

The structures of glycopeptides **1** and **2** were confirmed by NMR spectroscopy, which showed three NHAc and six CH_3Thr units for both compounds, as well as the corresponding characteristic ^{1}H signals for sugar H-1 (glycopeptide **1**) at 4.93 ppm ($J_{1,2}$ = 3.7 Hz) and for sugars H-1 and H-1″ (glycopeptide 2) at 4.84–4.77 ppm ($J_{1,2}$ = 3.5 Hz). ESI-MS analysis also showed characteristic adducts for **1** (observed $[M + Na]^+$ 1314.4) and **2** (observed $[M+H+K]^+$ 1493.6).

For prospective further use in immunization assays, glycopeptides **1** and **2** were conjugated to the ovalbumin (OVA) carrier protein. Thus, the coupling reactions of **1** and **2** to OVA were performed in aqueous Na_2HPO_4 buffer at pH 9.0, in the presence of the reagents EDCI and NHS (Schemes 5 and 6).[12,52] The conjugated glycopeptides were purified by ultrafiltration (3 kDa membrane) against deionized water. The loading rates of the OVA conjugates of glycopeptides **1** and **2** were determined by MALDI-TOF mass spectrometry. On average, eight (49852.0) to 32 (86550.2) molecules of glycopeptide **1**-OVA

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 6. Solid-phase synthesis of glycopeptide **2**. Reagents and conditions: a) 20% piperidine in DMF; b) Fmoc-ThrOH, PyBOP, HOBt, DIPEA; c) αLacNAc-ThrOH (**6**), PyBOP, HOBt, DIPEA; d) βGal-αGalNAc-ThrOH (**7**), PyBOP, HOBt, DIPEA; e) TFA 95%; f) pyridine/acetic anhydride; g) NaOMe, MeOH; h) EDCI, NHS, Na_2HPO_4.

and 15 (69251.4) to 30 (88824.3) molecules of glycopeptide **2**-OVA were found to be linked to one OVA protein.

2.2. Biological assays

2.2.1. ELISA assays: To verify the capacity of glycopeptide conjugates **1**-OVA and **2**-OVA to induce humoral immune responses, each synthetic glycopeptide (10 μg) in combination with complete Freund's adjuvant (CFA) was injected into two groups of Balb/c mice. After an interval of two weeks, the second and third immunizations were performed with incomplete Freund's adjuvant (IFA). Prior to the first immunization and two weeks after the third immunization, blood was drawn from the eyelid vein of each mouse, and the obtained sera were used for analysis of the induced antibodies by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).[53] For comparative purposes, another group of two Balb/c mice was immunized solely with OVA under the same conditions as described for glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA, with subsequent sera collection and analysis by ELISA. In the ELISA tests, the microtiter plates were coated separately with glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA, as well as only with OVA as control. The sera were titrated at increasing dilutions (1/1000 to 1/64000) in a phosphate-buffered saline (PBS) solution. The antibody concentrations were detected photometrically (450 nm) by using a secondary anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP).[54] The titers of the ELISA tests were determined to be 1/16000 for mice immunized with glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA with use of these corresponding conjugates as coats. When coating was exclusively with OVA, however, the verified titers of the ELISA tests were 1/4000 for mice immunized either with glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA or with OVA (Figure 1). According to the obtained results, the employed mice immunization protocol proved to be effective in inducing the production of antibodies against antigenic structures related to *T. cruzi* and tumor mucins.

2.2.2. Flow cytometry assays: Flow cytometry assays were subsequently performed to evaluate the binding of antibodies induced by the glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ to cells of *T. cruzi* (Y strain) and epithelial breast tumor (MCF-7).[55] Prior to these assays, anti-*T. cruzi* and anti-MCF-7 sera were obtained for use as references by immunization of two Balb/c mice with *T. cruzi* and MCF-7 cells, under the conditions described above. Thus, *T. cruzi* and MCF-7 cells were incubated with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ at increasing dilutions (1/50 to 1/800), along with *T. cruzi* and MCF-7 antisera (1/1000). After washing, secondary antimouse-IgG antibodies from goat conjugated to a fluorescent label (Alexa Fluor 488) were added to the cells,

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

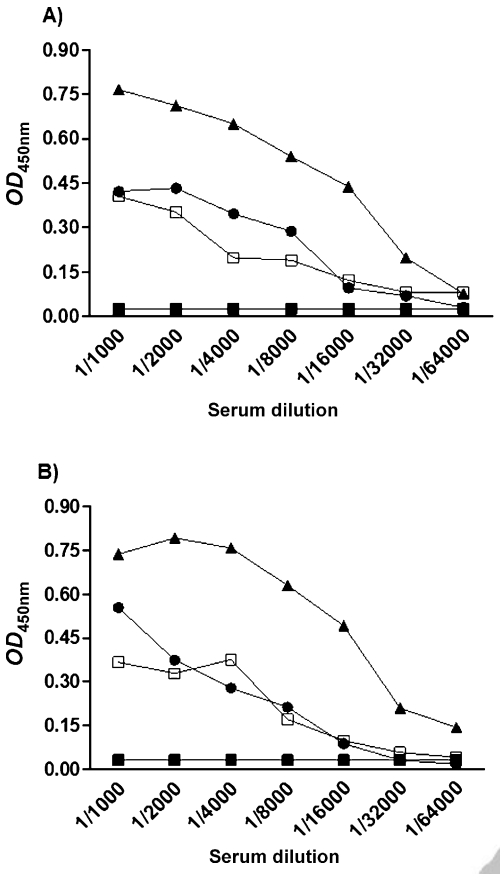


Figure 1. ELISA of the antisera induced by glycopeptides A) **1**-OVA and B) **2**-OVA. $OD_{450\,nm}$: optical density at 450 nm. ▲: Immunizations with glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA and coating with corresponding glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA. ●: Immunizations with glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA and coating with OVA. □: Immunizations with OVA and coating with OVA. ■: Preimmune serum and coating with corresponding glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA.

which were then acquired and analyzed by flow cytometry. The cells recognized by the antibodies from the mouse antisera showed fluorescence and were counted separately (right area-P3). As can be seen in Figure 2-1 A,1 B, cells treated with buffer solution as negative control did not show positive staining, appearing in the left area (P2). The *T. cruzi* and MCF-7 cells that were incubated with the corresponding *T. cruzi* and MCF-7 antisera (1/1000) as references were all labeled and appeared in the right area (Figure 2-2 A,2 B). When *T. cruzi* cells were incubated with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■, they were strongly recognized by these antibodies, this being verified (Figure 2-3 A-1 to 7 A-1) by glycopeptide **1**■■**1**-OVA?■■ antisera binding values (percentage of positive staining) of 65% (1/50), 49% (1/100), 32% (1/200), 17% (1/400), and 11% (1/800), whereas glycopeptide **2**■■**2**-OVA?■■ antisera (Figure 2-3 A-2 to 7 A-2) displayed even higher binding values of 96% (1/50), 95% (1/100), 55% (1/200), 39% (1/400), and 12% (1/800). With regard to MCF-7 cells, antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ displayed moderate recognition for these cells at 1/50 and 1/100 dilutions, with corresponding binding values varying from 40% to 20% (Figure 2-3 B-1, 4 B-1; 3 B-2, 4 B-2), but with low recognition binding values (12–2%) being observed for increased dilutions (1/200, 1/400, and 1/800) of antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ (Figure 2-5 B-1 to 7 B-1; 5 B-2 to 7 B-2).

Therefore, it is possible to assert that the flow cytometry data obtained with *T. cruzi* and MCF-7 cells, which express native mucin glycopeptides, are in accordance with the ELISA results strictly based on the synthetic glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■. Moreover, the fact that the antibodies induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ were strongly recognized by *T. cruzi* cells and moderately recognized by MCF-7 cells is very significant in view of the high complexity of the natural related structures of *T. cruzi* and tumor mucins, the essential scaffolds of which are represented by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■.

2.2.3. Inhibition assay of Trypanosoma cruzi *cell invasion*: The satisfactory results obtained from flow cytometry assays with *T. cruzi* cells prompted us to assess the abilities of antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ to block the invasion of fibroblast cells (LLCMK2—monkey kidney epithelial cells) by *T. cruzi* trypomastigotes (Y strain).[56,57] Thus, different groups of parasites were treated with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ at a dilution of 1/50, as well as with the preimmune sera (1/50); parasites without any treatment (no serum) were used as negative control. Subsequently, the parasites were incubated with LLCMK2 cells previously adhered to glass slides for 2 h; these were then washed, fixed, and stained for counting of the internalized parasites. As can be seen in Figure 3, a remarkable reduction in *T. cruzi* cell invasion was observed for those parasites treated with the antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ (68%) and, as expected, this effect was not observed when preimmune serum was used, with the number of internalized parasites in these slides being quite similar to that found in the control assay (no serum, Figure 3). Further assays with a high-content imaging system also showed a noteworthy reduction in *T. cruzi* cell invasion,[58] according to which fewer CFSE-stained (CFSE: carboxylfluorescein succinimidyl ester) trypomastigotes forms were detected for parasites treated with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■, relative to those treated with preimmune sera or no serum (see Figure S11).

Such observations raised the question of the mechanism by which these glycopeptides antisera can block *T. cruzi* cell invasion, either through strong interactions with the natural mucins, with possible inhibition of their sialylation catalyzed by *T. cruzi* cell surface *trans*-sialidase (TcTS), which is the key mechanism for cell invasion, or by direct inhibition of this enzyme, leading to blocking of sialic acid transfer to acceptor mucins. Therefore, in view of the possibility of the latter hypothesis, TcTS inhibition by antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ was investigated by the continuous fluorimetric method, which is based on TcTS-catalyzed MuNANA [2′-(4-methylumbelliferyl)-α-D-*N*-acetylneuraminic acid■■OK?■■] hydrolysis.[59] Antisera induced by lycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ were then

© WILEY-VCH Gatelfold proof

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

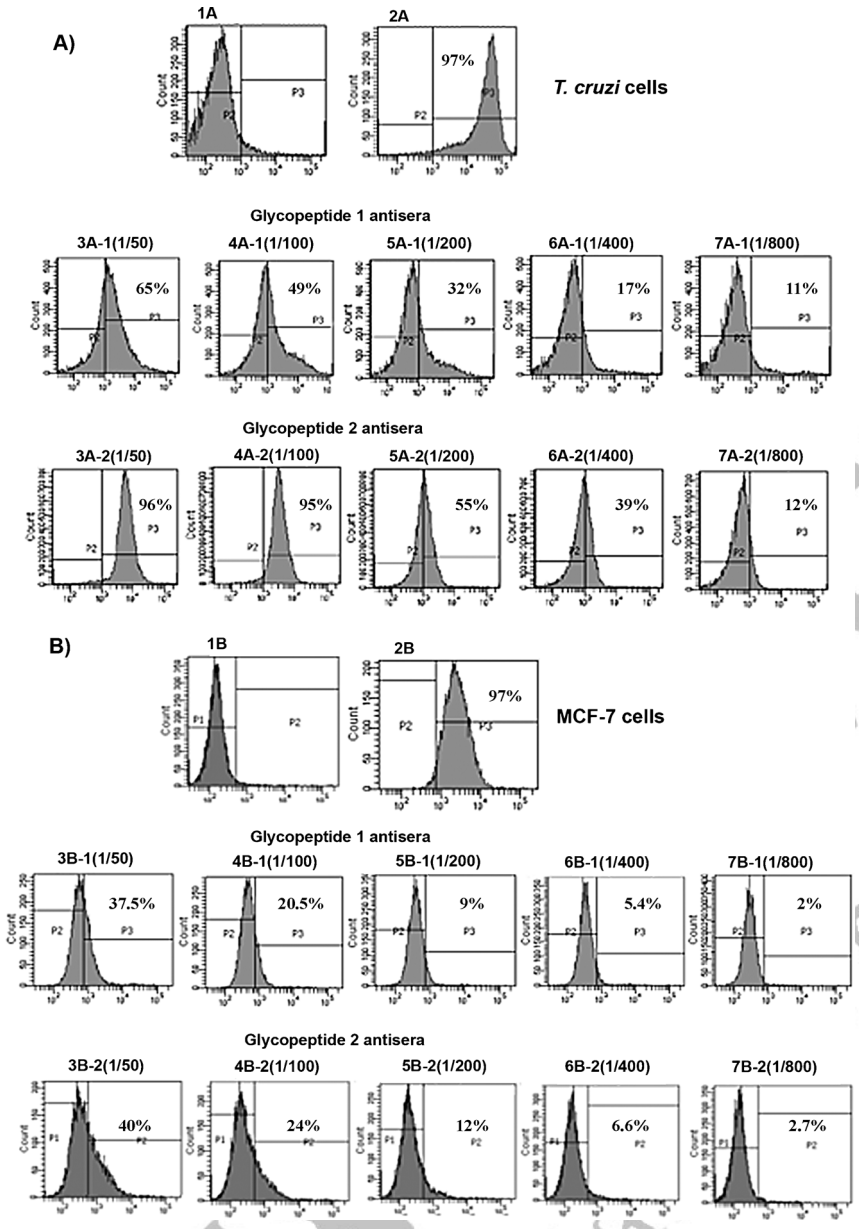


Figure 2. Flow cytometry analysis of the binding (percentages of positive staining) of antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA? Please check all in Figure 2 caption.■■ to A) *T. cruzi* and B) MCF-7 cells. 1A) *T. cruzi* cells treated with buffer solution. 2A) *T. cruzi* cells incubated with *T. cruzi* antisera. 3A-1 to 7A-1) *T. cruzi* cells incubated with antiserum induced by glycopeptide **1**-OVA at increasing dilutions of 1/50 to 1/800. 3A-2 to 7A-2) *T. cruzi* cells incubated with antiserum induced by glycopeptide **2**-OVA at increasing dilutions of 1/50 to 1/800. 1B) MCF-7 cells treated with buffer solution. 2B) MCF-7 cells incubated with MCF-7 antisera. 3B-1 to 7B-1) MCF-7 cells incubated with antiserum induced by glycopeptide **1**-OVA at increasing dilutions of 1/50 to 1/800. 3B-2 to 7B-2) MCF-7 cells incubated with antiserum induced by glycopeptide **2**-OVA antisera at increasing dilutions of 1/50 to 1/800.

tested at 1/100 dilution in PBS, along with the preimmune sera (1/100); TcTS-catalyzed reaction in the absence of any serum was also performed as negative control. As a result, no TcTS inhibition was detected for the tested antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ and preimmune sera (see Figure S12), which led us to favor the first hypothesis of possible blocking interactions between the parasite mucins and antibodies elicited by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■. Thus, in association with ELISA and flow cytometry results, the antisera induced by glycopeptides **1** and **2** seem to display strong recognition of the mucin molecules on *T. cruzi* cell surfaces, and this might hamper the *T. cruzi* cell invasion.

2.2.4. Antibody-mediated cell cytotoxicity (ADCC) assay: In connection with the described flow cytometry assays with MCF-7 cells, ADCC assays involving the antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ were next performed.[60,61] Firstly, MCF-7 cells were plated in a 96-well plate and, after adhesion, they were incubated with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ at a dilution of 1/50, as well as with the preimmune sera (1/50); MCF-7 cells with no serum were used as negative control. Subsequently, previously produced lymphokine-activated killer (LAK) cells were added to the wells containing MCF-7 cells, in a ratio of 5:1 (LAK/target cells), with further incubation for 18 h. LAK cells were then removed by washing with PBS, and the viability of the remaining MCF-7 cells was analyzed by MTT assay. As shown in Figure 4, MCF-7 cells treated with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ displayed reduced viability, with values of 46.5 and 53.7% relative to the viability of cells treated with preimmune sera■■serum?■■ (70.6%) or untreated cells (73%). Thus, as judged by these cell viability values, antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ were, to some extent, able to elicit ADCC against MCF-7 cells. These results, together with the observations from flow cytometry assays, allow us to assert that the antibodies elicited against glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ were able both to recognize MCF-7 cells and to evoke ADCC, thus highlighting the potential influence of these antibodies in the tumor growth inhibition.

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

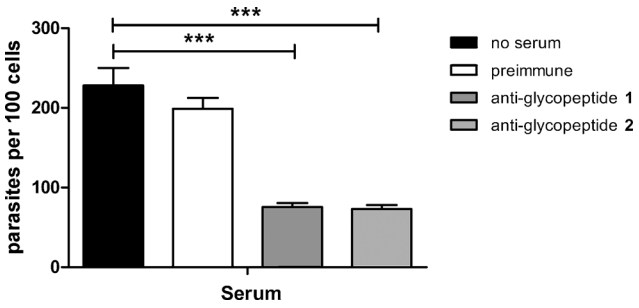


Figure 3. Inhibition of *T. cruzi* LLCMK2 cell invasion after treatment with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ (1/50) and preimmune serum (1/50). The number of parasites inside 300 cells per glass slide were counted after staining; the results are expressed as parasites per 100 cells. The assays were carried out in triplicate. *** $p < 0.001$, antisera ■■antiserum?■■ reduction in parasite entry relative to control with no serum (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test).

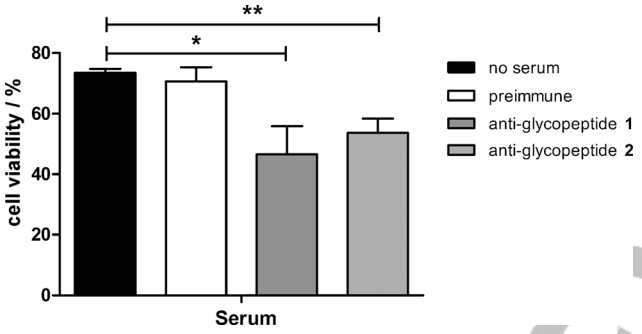


Figure 4. ADCC assay against MCF-7 breast tumor cells after treatment with antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ (1/50), MCF-7 antiserum (1/1000), and preimmune serum (1/1000). The assays were carried out in quadruplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, antisera■■antiserum?■■ induced ADCC compared with no serum control (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test).

3. Conclusions

In summary, we have developed the synthesis of the glycopeptides NHAc[βGal]-(Thr)$_2$-[αGalNAc]-(Thr)$_2$-[αGlcNAc]-(Thr)$_2$Gly-OVA (**1**-OVA) and NHAc[βGal-αGalNAc]-(Thr)$_3$-[αLacNAc]-(Thr)$_3$-Gly-OVA (**2**-OVA), related both to *T. cruzi* and to tumor mucin glycoproteins, by a combination of glycosylation and solid-phase methods. In this regard, the applicability of $HgBr_2$ as a catalyst was broadened in the synthesis of the key intermediate glycosyl amino acids αGlcNAc-ThrOH (**3**), αGalNAc-ThrOH (**4**), and αLacNAc-ThrOH (**6**), whereas the remaining βGal-ThrOH (**5**) and βGal-αGalNAc-ThrOH (**7**) were obtained by using the corresponding iodine and AgOTf glycosylation catalysts.

According to early-phase ELISA tests, immunization of mice with glycopeptides **1** and **2** conjugated to OVA induced the production of high titers (1/16 000) of antibodies, the capacity of which to bind to both *T. cruzi* and MCF-7 tumor cells was confirmed by flow cytometry assays, with high binding values being verified for *T. cruzi* (65 to 95%—1/50) and moderate binding values for MCF-7 cells (37 to 40%—1/50). In the latter part of biological assays, the antibodies elicited by anti-glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ caused a significant reduction in *T. cruzi* fibroblast cell invasion (68%), besides being able to elicit ADCC against MCF-7 cells, as judged by their reduced viability (around 50%).

Experimental Section

General: All chemicals were purchased as reagent grade and used without further purification. Solvents were dried by standard methods.[62] Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on 0.25 nm precoated silica gel plates (Whatman, AL SIL G/UV, aluminium backing) with the indicated eluents. Compounds were visualized under UV light (254 nm) and/or by dipping into ethanol/sulfuric acid (95:5, *v/v*), followed by heating the plate for a few minutes. Column chromatography was performed on silica gel 60 (Fluorochem, 35–70 mesh) or on a Biotage Horizon High-Performance FLASH Chromatography system with 12 or 25 mm flash cartridges and the indicated eluents. NMR spectra were recorded with Bruker Advance DRX 300 (300 MHz), DPX 400 (400 MHz), or DPX 500 (500 MHz) spectrometers. Chemical shifts (δ) are given in parts per million downfield from tetramethylsilane. Assignments were made with the aid of HMQC and COSY experiments. Accurate mass electrospray ionization mass spectra [HRMS (ESI)] were obtained in positive or negative ionization modes with a Bruker Daltonics MicroOTOF II ESI-TOF mass spectrometer. MALDI-TOF analyses were acquired by use of the positive ionization mode with an UltrafleXtreme (Bruker, Billerica) mass spectrometer. Absorbance of 96-well ELISA plates was measured at 450 nm with a spectrophotometer (SpectraMax—Molecular Device). FACS analyses were performed with a FACSCanto II flow cytometer equipped with FACSDiva software (BD Biosciences).

Synthesis of glycosyl amino acids

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (24)**: A solution of silver triflate (404 mg, 1.58 mol) in dry toluene (7 mL) was added at −25 °C to a mixture of *N*-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (**23**, 556 mg, 0.78 mmol) and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl bromide (**21**, 648 mg, 1.58 mmol) in dry CH_2Cl_2 (7 mL). After 1 h, pyridine (1 mL) was added, and the reaction was left to stir at −25 °C for a further 5 min. The mixture was filtered through Celite and concentrated in vacuo after warming to room temperature. After purification by column chromatography, *N*-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (**24**, 500 mg, 0.48 mmol, 61%) was isolated as a white foam. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta_H = 7.77$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2H; C*H* Fmoc arom.), 7.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H; C*H* Fmoc arom.), 7.52 (dd, $J_1 = 1.2$, $J_2 = 7.4$ Hz, 2H; *ortho*-ArH from benzylidene group), 7.42–7.28 (m, 12H; C*H* Fmoc arom, ArH from Bn group, *meta* and *para* ArH from benzylidene group), 5.77 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H; NH), 5.52 (s, 1H; C*H*-Ar), 5.40 (d, 1H; H-4′), 5.29 (dd, 1H; H-2′), 5.21 (s, 2H; CH_2-Ar), 5.03 (dd, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, 1H; H-3′), 4.92 (d, 1H; H-1), 4.77 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H; H-1′), 4.56–4.41 (m, 3H; CH_{2a} Fmoc, αC*H*Thr, βC*H*Thr), 4.39–4.08 (m, 6H; C*H* Fmoc, H-4, H-$6_{a'}$, H-6_b, H-$6_{b'}$, CH_{2b} Fmoc), 4.01 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H; H-6_a), 3.99 (dd, $J_{3,4} = 3.1$ Hz, 1H; H-3), 3.93 (t, $J_{4,5} = 1.2$, $J_{5,6} = 5.4$ Hz, 1H; H-5′), 3.74 (dd, $J_{1,2} = 3.5$, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, 1H; H-2), 3.63 (s, 1H; H-5), 2.15, 2.04, 2.02, 1.98 (4s, 12H; 4CH_3CO), 1.30 ppm (d, $J = 6.4$ Hz, 3H; CH_3 Thr); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta_C = 102.4$ (C-1′), 100.7 (CH-Ar), 99.4 (C-1), 76.1 (βCHThr), 75.9 (C-3), 75.6 (C-4), 71.0, 70.9 (C-3′, C-5′),

© WILEY-VCH
Galley Proof

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

69.0 (C-6), 68.6 (C-2′), 67.7 (CH_2-Ar), 67.3 (CH_2Fmoc), 66.9 (C-4′), 63.5 (C-5), 61.3 (C-6′), 59.0 (C-2), 58.7 (αCHThr), 47.1 (CHFmoc), 20.6, 20.4 (4×$COCH_3$), 19.1 (CH_3Thr); HRMS (ESI): calcd. for $C_{53}H_{57}N_4O_{18}$ $[M+H]^+$: 1037.3668; found: 1037.3669.

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-4,6-di-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (26)**: *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D galactopyranosyl-(1→3)-2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (**24**, 500 mg, 0.48 mmol) was dissolved in minimum amount of acetic acid (80% aqueous solution, 8 mL), and the mixture was stirred at 70 °C for 4 h. The mixture was concentrated in vacuo and purified by column chromatography (EtOAc/hexane 4:1, *v/v*), affording the product *N*-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-azido-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (**26**, 374 mg, 0.39 mmol, 82%).

Subsequently, compound **26** (350 mg, 0.37 mmol) was added to a mixture of THF/Ac_2O/AcOH (3:2:1, *v/v/v*, 14 mL) and treated with zinc (310 mg, 3.2 mmol) and $CuSO_4$ (saturated aqueous solution, 0.5 mL). After stirring for 1 h the reaction mixture was filtered through Celite and purified by column chromatography (EtOAc/hexane 4:1, *v/v*), affording the product *N*-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (**25**, 306.5 mg, 0.31 mmol, 88%) as a white foam. Compound **25** (300 mg, 0.31 mmol) was then dissolved in pyridine (4.5 mL) and Ac_2O (2.5 mL), and after 18 h the mixture was concentrated and purified by column chromatography (EtOAc/hexane 7:3, *v/v*), giving the product *N*-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-4,6-di-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (**27**, 301.5 mg, 0.28 mmol, 92%) as an amorphous solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H; C*H* Fmoc arom.), 7.61 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H; C*H* Fmoc arom.), 7.42–7.31 (m, 9H; C*H* Fmoc arom., C*H* Bn arom.), 5.82 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H; N*H*Ac), 5.59 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H; N*H*Fmoc), 5.36 (m, 2H; H-4, H-4′), 5.23–5.03 (m, 3H; H-2′, CH_2Bn), 4.95 (dd, $J_{2,3}$ = 10.5, $J_{3,4}$ = 2.9 Hz, 1H; H-3′), 4.81 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H; H-1), 4.56 (d, $J_{1,2}$ = 7.9 Hz, 1H; H-1′), 4.54–4.37 (m, 4H; H-2, CH_2Fmoc, αC*H*Thr), 4.29–4.04 (m, 6H; H-5, H-$6_{a'}$, H-6_b, H-$6_{b'}$, C*H*Fmoc, βC*H*Thr), 3.95 (dd, $J_{5,6}$ = 7.3, $J_{6,6'}$ = 11.1 Hz, 1H; H-6_a), 3.88 (t, $J_{5,6}$ = 6.4 Hz, 1H; H-5′), 3.79 (dd, $J_{2,3}$ = 11.1, $J_{3,4}$ = 2.2 Hz, 1H; H-3), 2.15–1.97 (7×s, 21H; CH_3CO), 1.30 ppm (d, *J* = 6.5 Hz, 3H; CH_3Thr); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ_C = 100.6 (C-1′), 100.0 (C-1), 76.7 (βCHThr), 73.0 (C-3), 70.7 (C-3′, C-5′), 68.6 (C-2′, C-4), 67.8 (C-5), 67.7 (CH_2-Ar), 67.0 (CH_2Fmoc), 66.6 (C-4′), 62.9 (C-6), 61.0 (C-6′), 58.6 (αCHThr), 48.6 (C-2), 47.1 (CHFmoc), 23.3 ($CONCH_3$), 21.0, 20.6 (3■■C-3?■■), 20.5 (6×$COCH_3$), 18.2 ppm (CH_3Thr); HRMS (ESI): calcd. for $C_{52}H_{61}N_2O_{21}$ $[M+H]^+$: 1049.3767; found: 1049.3775.

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-4,6-di-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine (7)**: A solution of *N*-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-4,6-di-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine benzyl ester (**27**, 300 mg, 0.28 mmol) in methanol (3 mL) was treated with glacial AcOH (0.6 mL) and Pd/C (10%, 30.5 mg) for removal of the *O*-Bn group. The reaction mixture was stirred and kept under H_2 (≈1.5 atm) for 1 h, and was subsequently filtered through Celite, concentrated in vacuo, and purified by column chromatography (CH_2Cl_2/MeOH 9:1, v:v), affording the compound *N*-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-4,6-di-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine (**7**, 235 mg, 0.24 mmol, 86%) as a white foam. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H; C*H* Fmoc arom.), 7.80 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H; C*H* Fmoc arom.), 7.59–7.40 (m, 4H; C*H* Fmoc arom.), 5.46 (d, $J_{3,4}$ = 2.8 Hz, 1H; H-4), 5.42 (d, $J_{3',4'}$ = 2.3 Hz, 1H; H-4′), 5.11–5.03 (m, 3H; H-2′, H-1, H-3′), 4.74 (d, $J_{1',2'}$ = 7.8 Hz, 1H; H-1′), 4.65 (dd, *J* = 6.2, 10.6 Hz, 1H; CH_aFmoc), 4.56 (dd, *J* = 6.2, 10.8 Hz, 1H; CH_bFmoc), 4.45 (dd, $J_{1,2}$ = 3.3, $J_{2,3}$ = 10.8 Hz, 1H; H-2), 4.40–4.27 (m, 3H; βC*H*Thr, αC*H*Thr, C*H*Fmoc), 4.24–4.16 (m, 3H; H-5, H-6′a, H-6′b), 4.10–3.98 (■■m, ?■■3H; H-3, H-6a, H-6b), 3.80 (m, 1H; H-5′), 2.21–1.90 (7×s, 21H; 6×$COCH_3$, $CONCH_3$), 1.31 ppm (d, *J* = 6.0 Hz, 3H; CH_3Thr); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ_C = 100.3 (C-1′), 99.5 (C-1), 77.3 (βCHThr), 72.5 (C-3), 70.7, 70.6, (C-5′, C-3′), 68.8 (C-2′, C-4), 67.6 (C-5), 66.9 (CH_2Fmoc), 66.6 (C-4′), 62.8 (C-6), 61.0 (C-6′), 58.5 (αC*H*Thr), 49.0 (C-2), 47.1 (CHFmoc), 22.6 ($CONCH_3$), 21.4, 21.1, 20.6 (2), 20.5 (6×$COCH_3$), 18.3 ppm (CH_3Thr); HRMS (ESI): calcd. for $C_{45}H_{55}N_2O_{21}$ $[M+H]^+$: 959.3297; found: 959.3293.

General method for glycopeptide synthesis: The glycopeptides **1** and **2** were assembled manually by use of a fritted glass reaction vessel with nitrogen purging for effective mixing. Pre-loaded FmocGly-Wang resin (typically 100 mg) was swollen in CH_2Cl_2 for 2 h and then washed with DMF (3×). Removal of the *N*-α-Fmoc group was carried out with piperidine/DMF (20%), followed by filtration and washing with DMF (3×). Coupling reactions were performed with 2.0 mol equiv of the appropriate Fmoc-amino acid and coupling agents (PyBOP and HOBt) dissolved in DMF, and the base DIPEA. Coupling times were variable, ranging from 3 to 24 h for the threonine amino acids and between 24 and 72 h for the glycosyl amino acids **3**, **4**, **5**, **6**, and **7**. The reaction mixtures were filtered after each coupling, and the resin was washed three times with DMF, CH_2Cl_2, and MeOH. After drying in vacuo, small aliquots of resin (1 mg) were treated with piperidine in DMF (20%) for removal of the *N*Fmoc group and consequent generation of the dibenzofulvene product, which absorbs UV strongly (290 nm), thus allowing spectrophotometric monitoring of coupling reactions. After removal of the *N*Fmoc group of the last amino acid, the glycopeptide was cleaved from resin in the presence of TFA in water (95%). After cleavage was complete, the solution was filtered to remove the cleaved resin and concentrated to a yellowish oil. The crude glycopeptides were triturated with cold Et_2O, dried in vacuo, *N*-acetylated with Py and Ac_2O, and *O*-deprotected with sodium methoxide solution in MeOH (1 M). The purification of glycopeptides **1** and **2** was carried out on Shimadzu Shim-PaK HPLC equipment by gel filtration chromatography with a TSKGEL G2000 column (30 cm×7.5 mm), eluted with water containing TFA (0.1%) at a flow rate of 1.0 mL min.$^{-1}$, with UV detection (208–240 nm). Under these conditions the retention times for glycopeptides **1** and **2** were 6.2 and 5.7 min, respectively.

NHAc[βGal]-$(Thr)_2$-[αGalNAc]-$(Thr)_2$-[αGlcNAc] $(Thr)_2$GlyOH (1): Glycopeptide **1** was obtained as an amorphous solid (15.0 mg, 0.012 mmol, 16%) by the outlined standard peptide synthesis procedure, followed by gel filtration chromatography. ^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz): δ_H = 4.93 (d, $J_{1,2}$ = 3.7 Hz, 1H; H-1), 4.61–4.53 (2 d■■2×d? dd?■■, $J_{1',2'}$ = 3.7 Hz, $J_{1'',2''}$ = 8.3 Hz, 2H; H-1′, H-1″), 4.46–4.22 (m, 6H; αC*H*Thr), 4.20–4.0 (m, 6H; βCHThr), 3.93–3.47 (m, 17H; CH_2Gly, H-6a, H-6b, H-6′a, H-6′b, H-6″a, H-6″b, H-2, H-2″, H-3, H-4, H-4′, H-4″, H-5, H-5′, H-5″), 3.45–3.25 (m, 3H; H-3′, H-3″, H-2′), 1.97–1.88 (3×s, 9H; $NHCOCH_3$), 1.23–1.04 ppm (m, 18H; CH_3 Thr); HRMS (ESI): calcd. for $C_{50}H_{85}N_9O_{35}Na^+$ $[M+Na]^+$: 1314.5294; found: 1314.4662.

NHAc[βGal-αGalNAc]-$(Thr)_3$-[αLacNAc]-$(Thr)_3$-GlyOH (2): Glycopeptide **2** was obtained as an amorphous solid (11.0 mg,

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

0.0076 mmol, 12%) by the outlined standard peptide synthesis procedure, followed by gel filtration chromatography. ^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz): δ_H = 4.84–4.77 (2×d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 2H; H-1, H-1′′), 4.63–4.59 (2×d, $J_{1,2}$ = 8.4 Hz, 2H; H-1′, H-1′′′), 4.52–4.29 (m, 6H; αC*H*Thr), 4.27–4.10 (m, 6H; βCHThr), 4.0–3.10 (m, 26H; CH_2Gly, H-6a, H-6b, H-6′a, H-6′b, H-6″a, H-6″b, H-6′′′a, H-6′′′b, H-4, H-4′, H-4″, H-4′′′, H-5, H-5′, H-5″, H-5′′′, H-2, H-2′, H-2″, H-2′′′, H-3, H-3′, H-3″, H-3′′′), 2.04–1.92 (3×s, 9H; NHCOCH_3), 1.20–1.06 (m, 18H; CH_3 Thr); HRMS (ESI): calcd. for $C_{56}H_{95}N_9O_{35}.H^+K^+$■■$C_{56}H_{96}N_9O_{35}K$?■■ $[M+H+K]^+$: 1493.5634; found: 1493.6416.

General procedure for coupling of glycopeptides 1 and 2 to OVA: Glycopeptides **1** and **2** (1.5 mg, 1 μmol, 45 equiv) were dissolved in water (100 μL) and treated with the coupling reagents EDCI (100 μg, 1 μmol) and NHS (100 μg, 1 μmol). The reaction mixtures were allowed to stand at room temperature with occasional gentle mixing, and after 50 min they were added to a solution of OVA (1 mg, 1 equiv) in Na_2HPO_4 buffer (pH 9.0, 20 mM, 100 μL), previously precooled to 4 °C. The solutions were then allowed to react for 48 h at room temperature and subsequently purified by ultrafiltration (AMICON ULTRA-0.5-MWCO 3 kDa). After lyophilization the obtained conjugates (approximately 3.0 mg) were analyzed by MALDI-TOF MS. For glycopeptide **1**-OVA a peak of mass 45527.5, corresponding to unreacted OVA, was verified, together with peaks of mass 49852.0, 82465.4, 86550.2, and 91013.1, consistent with 8, 29, 32, and 36 epitopes, respectively, per OVA. For glycopeptide **2**-OVA, peaks of mass 46381.7, 69251.4, and 88824.3, corresponding to 1, 15, and 30 epitopes, respectively, per OVA, were observed.

Biological assays

Mice immunization: A solution of glycopeptide conjugate **1**-OVA or■■OK? Or were both conjugates in one solution?■■ **2**-OVA (10 μg) in PBS, in combination with complete Freund's adjuvant (CFA), was injected into two different Balb/c mice. After an interval of two weeks, the second and third immunizations were performed by use of an emulsion with incomplete Freund's adjuvant (IFA).

The immunization protocol for *T. cruzi* and MCF-7 cells was similar to that used for glycopeptides **1**-OVA and **2**-OVA, with utilization of 1×10^6 (dead) *T. cruzi* cells and 1×10^6 lysed MCF-7 cells, obtained by extraction with cell lysis buffer.

Enzyme-linked immunoabsorbent assay: ELISA plates (96-well) were coated with glycopeptide conjugate **1**-OVA or **2**-OVA or only with OVA and incubated overnight at 4 °C. The plates were then washed with PBS buffer and blocked with PBS containing BSA (1%) for 2–3 h at 37 °C. After washing with Tween PBS buffer (0.05%), the mouse sera diluted in PBS were added to the plates at the appropriate dilutions and incubated for 90 min at 37 °C. Subsequently, the plates were washed and incubated with horseradish peroxidase conjugated to rabbit anti-mouse IgG Ab for 1 h at 37 °C. The plates were then washed, and the substrate solutions of 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (TMB) and H_2O_2 were added. After 10 min, a solution of sulfuric acid (2 N) was added, and the absorbance of each well was measured at 450 nm by spectrophotometer (SpectraMax—Molecular Device).

Flow cytometry analysis: *T. cruzi* (Y strain) and MCF-7 cells were washed with PBS (3×) for removal of remnants of RPMI media, followed by counting and distribution in flow cytometry tubes (10^6 cells per tube). Cells were then incubated with FcR blocking reagent for 1 h and washed with PBS (3×, 1500 rpm, 4 °C). Subsequently, antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ at increasing dilutions (1/50 to 1/800), along with *T. cruzi* and MCF-7 antisera (1/1000), were added to the cells, with incubation for 1 h. After washing, secondary (from goat) anti-mouse-IgG antibodies carrying a fluorescent label (AlexaFluor 488) were added to the cells. The analysis of cells was then performed by flow cytometry with a FACSCanto II flow cytometer equipped with FACSDiva software (BD Biosciences).

Trypanosoma cruzi invasion blocking assay

Parasites and host cells: The method for obtaining *T. cruzi* trypomastigotes (Y strain) in cultured monkey kidney epithelial cells (LLC-MK2) has been described previously.[56] LLC-MK2 cell monolayers were grown in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (FBS, 10%), penicillin (100 UI mL^{-1}), streptomycin (100 μg mL^{-1}), and L-glutamine (2 mM) at 37 °C in an incubator (under 5% CO_2). The trypomastigotes, released from the cultured cells around the 5–6th day after inoculation, were then washed three times in RPMI before experimental use.

Host cell invasion assay: LLC-MK2 cells were plated in RPMI-1640 containing FBS (10%) 24 h before the assay, at a density of 1×10^4 cells cm^{-2}, in 24-well dishes containing glass coverslips, as described.[56] Active tissue-culture-derived trypomastigotes were preincubated for 1 h at 4 °C in RPMI without FBS, containing the corresponding antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ (1/50), preimmune sera (1/50), or no serum. After the preincubation period, LLC-MK2 monolayer cultures were washed twice with sterile PBS to remove FBS from medium and infected with 1×10^5 pretreated trypomastigotes in RPMI-1640 (100 μL) without FBS under a humidified atmosphere containing CO_2 (5%). The concentration used for the preincubation period were maintained during incubation with the cell monolayer. After 2 h at 37 °C, the monolayers were washed three times with PBS, and the coverslips were stained with Romanovsky-type dye. The parasites adhered or inside 300 fibroblasts cells per coverslip were counted under a 100× oil immersion objective. The results, expressed as the number of parasites per 100 cells, represent the means of three coverslips per experiment.

Alternatively, LLC-MK2 cells were plated at a density of 1×10^4 cells cm^{-2} in 96-well dishes with black walls and clear bottoms. Active tissue-culture-derived trypomastigotes were stained with CFSE (carboxylfluorescein succinimidyl ester, 5 μM) for 30 min, washed, and preincubated for 1 h with the appropriate sera. After the preincubation period, LLC-MK2 monolayer cultures were washed twice and infected with pretreated trypomastigotes (1×10^5) in RPMI-1640 (100 μL) without FBS under a humidified atmosphere containing CO_2 (5%). After 2 h at 37 °C, the monolayers were washed three times with PBS, the cells were fixed with paraformaldehyde (4%), and the images were acquired with an ImageXpress Micro Widefield High-Content Imaging System (Molecular Devices). The parasite content per cell and per nine sites in each well were analyzed with the aid of MetaXpress software (Molecular Devices) and expressed as parasites per site.

Fluorimetric TcTS inhibition assays: TcTS inhibition was assessed by using the continuous fluorimetric assay described by Douglas and co-workers.[59] Briefly, the assays were performed in triplicate in 96-well plates containing phosphate buffer solution (pH 7.4, 25 μL), recombinant TcTS solution (25 μL), and the appropriate antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ (1/100) or preimmune sera (1/100; 25 μL). The obtained mixture was incubated for 10 min at 26 °C, followed by addition of MuNANA (25 μL of a 0.4 mM solution). The fluorescence of the released product (Mu) was measured after 5 min, at excitation and emission

© WILEY-VCH Galley Proofs

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

wavelengths of 360 and 460 nm, respectively, and the data were analyzed with the aid of GraphPad Prism software version 4.0 (San Diego, CA, USA).

Antibody-mediated cell-cytotoxicity (ADCC) assay

Lymphokine-activated killer (LAK) cultures: For in vitro generation of lymphokine-activated killer (LAK) cultures, spleens from Balb/c mice were dispersed in a cell strainer, and 5×10^6 cells mL^{-1} were cultured for 2 days in RPMI-1640 medium supplemented with FBS (10%), penicillin (100 U mL^{-1}), streptomycin (100 μg mL^{-1}), L-glutamine (2 mM), and 10% IL-2-enriched supernatant of P815-IL-2 mouse melanoma (a high secreting IL-2 melanoma, containing approximately 20 ng mL^{-1} of IL-2) at 37 °C in an incubator under CO_2 (5%). LAK cells were then harvested, washed, and counted for ADCC experiments.

Cell lines: The human breast cancer cell line MCF-7 was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with FBS (10%), penicillin (100 U mL^{-1}), streptomycin (100 μg mL^{-1}), and L-glutamine (2 mM). Cells were grown in monolayers in 75 mm^2 flasks at 37 °C under a humidified atmosphere with CO_2 (5%) prior to use. For ADCC experiments, 2×10^4 cells per well were added to a 96-well plate with the supplemented RPMI-1640 for 18 h before incubation with LAK cells.

ADCC assay: Cytotoxicity assays were performed with a 5:1 effector to target (E/T) ratio with IL-2-activated LAK cells against cell lines in a MTT assay.[60] Antisera induced by glycopeptides **1** and **2**■■**1**-OVA and **2**-OVA?■■ (1/50), as well as preimmune sera (1/50), were diluted in RPMI 1640 medium without FBS and added to the plated and washed MCF-7 target cells 1 h prior to the assay, then being incubated for 18 h with LAK cells. Subsequently, the wells were washed three times with PBS for elimination of LAK and dead cells, and an MTT solution (0.5 mg mL^{-1}) was added to each well. After 4 h of incubation of the plate at 37 °C under a humidified atmosphere with CO_2 (5%), the supernatants were removed, and DMSO was added to the wells for dissolution of formazan. The optical density (OD) at 570 nm was obtained spectrophotometrically (SpectraMax—Molecular Device), and the results were expressed as percentages of viable cells relative to the MCF-7 control cells.

Acknowledgements

We acknowledge financial support and fellowships from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). We are grateful to Dra. Lílian Cataldi Rodrigues for technical assistance in some biological assays, Vinícius Palaretti for NMR analyses, and José Carlos Tomaz for MS (ESI) analyses.

Keywords: antibodies · antitumor agents · glycopeptides · mucins · *Trypanosoma cruzi*

[1] C. Brocke, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085 – 3112.
[2] M. Andrianifahanana, N. Moniaux, S. K. Batra, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2006**, *1765*, 189 – 222.
[3] C. A. Buscaglia, V. A. Campo, A. C. C. Frasch, J. M. Di Noia, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 229 – 236.
[4] " *Trypanosoma cruzi trans-Sialidase", I. Carvalho, V. L. Campo, P. Andrade in Enfermedad de Chagas: Estrategias en la Búsqueda de Nuevos Medicamentos* (Eds.: H. C. Meyer, M. González), Ridimedchag-Cyted, Mexico, **2012**, pp. 105 – 121.
[5] R. M. de Lederkremer, R. Agusti, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2009**, *62*, 311 – 366.
[6] L. Mendonça-Previato, L. Penha, T. C. Garcez, C. Jones, J. O. Previato, *Glycoconjugate J.* **2013**, *30*, 659 – 666.
[7] R. A. Ashmus, N. S. Schocker, Y. Cordero-Mendoza, A. F. Marques, E. Y. Monroy, A. Pardo, L. Izquierdo, M. Gállego, J. Gascon, I. C. Almeida, K. Michael, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5579 – 5583.
[8] W. T. Corey, M. F. Lima, F. Villalta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 29 – 34.
[9] J. Geiger, B. G. Reddy, G. A. Winterfeld, R. Weber, M. Przybylski, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4367 – 4377.
[10] E. Osinaga, *IUBMB Life* **2007**, *59*, 269 – 273.
[11] H. Cai, Z.-Y. Sun, Z.-H. Huang, L. Shi, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1962 – 1970.
[12] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551 – 7556; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662 – 7667.
[13] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624 – 7630; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798 – 7803.
[14] G. A. Winterfeld, A. I. Khodair, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1009 – 1021.
[15] S. F. Slovin, S. J. Keding, G. Ragupathi, *Immunol. Cell Biol.* **2005**, *83*, 418 – 428.
[16] S. J. Keding, A. Endo, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7023 – 7031.
[17] A. Hölemann, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 615 – 622.
[18] J. A. Robinson, *Chimia* **2007**, *61*, 84 – 92.
[19] S. Vichier-Guerre, R. Lo-Man, V. Huteau, E. Deriaud, C. Leclerc, S. Bay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3567 – 3570.
[20] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4421 – 4442.
[21] Q. Li, M. R. Anver, D. O. Butcher, J. C. Gildersleeve, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 971 – 979.
[22] T. Ju, I. O. Vivianne, R. D. Cummings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1770 – 1791; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1808 – 1830.
[23] R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14462 – 14472.
[24] N. K. Ibrahim, J. L. Murray, D. Zhou, E. A. Mittendorf, D. Sample, M. Tautchin, D. Miles, *J. Cancer* **2013**, *4*, 577 – 584.
[25] T. Freire, C. Robello, S. Soule, F. Ferreira, E. Osinaga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *312*, 1309 – 1316.
[26] E. C. Oliveira, M. S. B. Leite, J. A. R. Miranda, A. L. S. S. Andrade, S. B. Garcia, A. O. Luquetti, H. Moreira, *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 737 – 740.
[27] A. V. Zenina, E. G. Kravtsov, B. Tsetsegsaikhan, N. V. Yashina, M. V. Dalin, L. P. Karpenko, L. A. Sheklakova, V. B. Kallinikova, *Bull. Exp. Biol. Med.* **2008**, *145*, 352 – 354.
[28] C. S. Graebin, F. D. Uchoa, L. S. C. Bernardes, V. L. Campo, I. Carvalho, V. L. Eifler-Lima, *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2009**, *8*, 345 – 366.
[29] E. Castillo, M. A. Dea-Ayuela, F. Bolas-Fernandez, M. Rangel, M. E. Gonzalez-Rosende, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 4027 – 4051.
[30] A. Rassi, Jr., A. Rassi, J. A. Marin-Neto, *Lancet* **2010**, *375*, 1388 – 1402.
[31] E. Dumonteil, M. E. Bottazzi, B. Zhan, M. J. Heffernan, K. Jones, J. G. Valenzuela, S. Kamhawi, J. Ortega, S. P. Leon Rosales, B. Y. Lee, K. M. Bacon, B. Fleischer, B. T. Slingsby, M. B. Cravioto, R. Tapia-Conyer, P. J. Hotez, *Expert Rev. Vaccines* **2012**, *11*, 1043 – 1055.
[32] I. Quijano-Hernandez, E. Dumonteil, *Human Vaccines* **2011**, *7*, 1184 – 1191.
[33] V. L. Campo, I. Carvalho, S. Allman, B. G. Davis, R. A. Field, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2645 – 2657.
[34] I. Carvalho, S. L. Scheuerl, K. P. R. Kartha, R. A. Field, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1039 – 1043.
[35] M. B. Martins-Teixeira, V. L. Campo, M. Biondo, R. Sesti-Costa, Z. A. Carneiro, J. S. Silva, I. Carvalho, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1978 – 1987.
[36] D. Horton, *Methods Carbohydr. Chem.* **1972**, *6*, 282 – 285.
[37] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244 – 1251.
[38] H. Paulsen, J.-P. Holck, *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, *6*, 1121 – 1130.
[39] K. A. Winans, D. S. King, V. R. Rao, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11700 – 11710.
[40] R. M. van Well, K. P. R. Kartha, R. A. Field, *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 463 – 474.
[41] K. P. Ravindranathan Kartha, L. Ballell, J. Bilke, M. McNeil, R. A. Field, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 770 – 772.

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[42] L. Cipolla, F. Peri, C. Airoldi, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 92 – 121.
[43] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, *4*, 525 – 542.
[44] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 985 – 993.
[45] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957 – 981.
[46] A. F. G. Bongat, A. V. Demchenko, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 374 – 406.
[47] T. S. Kärkkäinen, K. P. R. Kartha, D. MacMillan, R. A. Field, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1830 – 1834.
[48] S. A. Mitchell, M. R. Pratt, V. J. Hruby, R. Polt, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2327 – 2342.
[49] J. C. Manimala, Z. T. Li, A. Jain, S. VedBrat, J. C. Gildersleeve, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2229 – 2241.
[50] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 880 – 885.
[51] W. C. Chan, P. D. White in *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, **2000**.
[52] H. Kunz, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 563 – 573.
[53] J. S. Plested, P. A. Coull, M. A. Gidney, *Methods Mol. Med.* **2003**, *71*, 243 – 261.
[54] A. Kurosaka, A. Yano, N. Itoh, Y. Kuroda, T. Niakagawa, T. Kawasaki, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4168 – 4172.
[55] A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8498 – 8503; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676 – 8681.
[56] G. Andriani, A. D. Chessler, G. Courtemanche, B. A. Burleigh, A. Rodriguez, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1298.
[57] G. Franchin, V. L. Pereira-Chioccola, S. Schenkman, M. M. Rodrigues, *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 2548 – 2554.
[58] O. Rausch, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 316 – 320.
[59] J. Neres, A. Buschiazzo, P. M. Alzari, L. Walsh, K. T. Douglas, *Anal. Biochem.* **2006**, *357*, 302 – 304.
[60] S. Cooley, L. J. Burns, T. Repka, J. S. Miller, *Exp. Hematol.* **1999**, *27*, 1533 – 1541.
[61] A. Iannello, A. Ahmad, *Cancer Metastasis Rev.* **2005**, *24*, 487 – 499.
[62] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, D. R. Perrin in *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, New York, **1980**.

Received: January 28, 2014
Published online on ■■ ■■, 0000

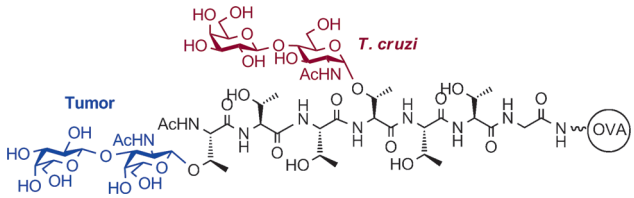
WILEY-VCH Galley Proofs

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

*V. L. Campo, T. B. Riul, I. Carvalho,**
*M.-D. Baruffi**

■■ – ■■

Antibodies against Mucin-Based Glycopeptides Affect *Trypanosoma cruzi* Cell Invasion and Tumor Cell Viability



New peptides get a standing OVAtion: The synthesis of the glycopeptides NHAc[βGal]-(Thr)$_2$-[αGalNAc]-(Thr)$_2$-[αGlcNAc]-(Thr)$_2$Gly-OVA (**1**-OVA) and NHAc[βGal-αGalNAc]-(Thr)$_3$-[αLacNAc]-(Thr)$_3$-Gly-OVA (**2**-OVA) as mimetics of both *T. cruzi* and tumor mucin glycoproteins could represent an innovative approach for the development of new immunotherapeutic/diagnostic strategies towards *T. cruzi* infection and tumors.

WILEY-VCH Galley Proofs

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim