

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

INTERFERÊNCIA DA GALECTINA-3 NO
CURSO DA INFECÇÃO POR
Paracoccidioides brasiliensis

LUCIANA PEREIRA RUAS

RIBEIRÃO PRETO – SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA PEREIRA RUAS

**Interferência da galectina-3 no curso da infecção por
*Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação Apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para
Obtenção do Título de Mestre em
Imunologia, Área de Concentração:
Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina
Roque Antunes Barreira

Ribeirão Preto – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Ruas, Luciana Pereira

Interferência da galectina-3 no curso da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*.

Luciana Pereira Ruas; orientador: Maria Cristina Roque-Barreira

Ribeirão Preto - SP, 2005. 87p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. galectina-3. 3. geneticamente deficiente

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Apoio financeiro: FAPESP e CNPq.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: célula apresentadora de antígeno

A/Sn: camundongo resistente à pcm

B.10A: camundongo susceptível à pcm

BHI: infusão cérebro-coração

BSA: albumina sérica bovina

CRD: domínio de reconhecimento de carboidratos

ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay” (ensaio imuno-enzimático)

Gal-3KO: animal geneticamente deficiente de galectina-3

H&E: hematoxilina e eosina

IFN- γ : interferon-gamma

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzível

LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

NK: células “natural killer”

NO: óxido nítrico

Pb18: *Paracoccidioides brasiliensis* cepa 18

PbAg: antígeno somático de *P. brasiliensis*

PBS: solução salina tamponada em fosfato

PBS-BSA: solução salina tamponada em fosfato acrescida de albumina sérica bovina

PCM: paracoccidioidomicose

RPMI-1640: meio de cultura de células

Th: linfócito T auxiliar

TMB: 3,3',5,5' tetrametilbenzidina

TNF- α : fator de necrose tumoral - alpha

UFC: unidade formadora de colônia

WT: animal selvagem ("wild type")

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Aspectos gerais da infecção por <i>Paracoccidoides brasiliensis</i>	1
2. Defesa imunitária contra a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	2
3. Interações Lectina-Carboidrato e Reconhecimento Celular	8
4. Galectina-3: interferência na resposta imune	10
OBJETIVOS	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Animais de experimentação	17
2. Cultura de <i>P. brasiliensis</i>	17
3. Determinação de viabilidade dos fungos para infecção	17
4. Componente antigênico utilizado como estímulo em ensaios <i>in vitro</i>	18
4.1. Antígeno total de Pb18 (PbAg)	18
5. Infecção dos animais	18
5.1. infecção intraperitoneal	18
5.2. infecção endovenosa	19
6. Recuperação das leveduras	19
7. Avaliação cinética da expressão tecidual de galectina-3 em camundongos C57Bl/6 infectados com <i>P. brasiliensis</i>	19
7.1. Infecção de camundongos C57Bl/6 com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	19
7.2. Análise histopatológica das lesões	20
7.3. Imunohistoquímica - detecção de galectina-3	21
8. Avaliação do curso da doença em animais geneticamente deficientes (gal- 3KO) ou não (WT) para o gene da galectina-3	22
8.1. Infecção de camundongos WT e gal-3KO com leveduras de <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	22
8.2. Análise histopatológica das lesões	23
8.3. Imunohistoquímica - detecção de galectina-3	23
8.4. Morfometria dos granulomas teciduais	23
8.5. Produção de citocinas por células esplênicas de animais gal-3KO e WT infectados com <i>P. brasiliensis</i>	24
8.5.1. Obtenção de células esplênicas e estimulação <i>in vitro</i>	24

8.5.2. Dosagem de IL-12 (p40 e p70), IFN- γ , IL-4, IL-10 e TNF- α	25
8.6. Obtenção das amostras de soro de animais infectados	25
8.7. Dosagem de anticorpos	26
9. Análise estatística dos resultados	27
RESULTADOS.....	28
1. 1. Avaliação cinética da expressão tecidual de galectina-3 em camundongos C57Bl/6 (WT) infectados com <i>P. brasiliensis</i>	28
1.1. Histopatologia pulmonar	28
1.2. Detecção de galectina-3 no tecido pulmonar	31
2. Avaliação do curso da infecção por <i>P. brasiliensis</i> em animais geneticamente deficientes para o gene de galectina-3 (gal-3KO)	34
2.1. Histopatologia das lesões hepáticas	34
2.2. Morfometria dos granulomas no fígado de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i>	35
2.3. Expressão de galectina-3 no fígado de camundongos gal-3KO e WT	40
2.4. Recuperação de leveduras dos órgãos provenientes de animais gal-3KO e WT infectados	45
2.5. Produção de citocinas por células esplênicas de animais gal-3KO e WT infectados ou não com <i>P. brasiliensis</i>	45
2.6. Avaliação da resposta imune humoral: dosagem de IgG1 e IgG2b no soro de animais gal-3KO e WT infectados com <i>P. brasiliensis</i>	47
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	64
RESUMO	65
ABSTRACT	68
BIBLIOGRAFIA CITADA	70
ANEXO	87

INTRODUÇÃO

1 - Aspectos gerais da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Paracoccidioides brasiliensis (Almeida, 1930; San-Blas, 1993) é o agente causador da paracoccidioidomicose (pcm), uma micose profunda e sistêmica, de fundo granulomatoso crônico. A doença constitui-se na mais freqüente micose sistêmica da América Latina, onde 80% dos casos relatados ocorrem no Brasil (Brummer *et al.*, 1993).

P. brasiliensis é um fungo termo-dimórfico que cresce na forma filamentosa (miceliar) a 25°C e na forma de levedura a 37°C (San-Blas & San-Blas, 1993). Pouco se sabe sobre o habitat natural do *P. brasiliensis*, mas o fungo já foi encontrado em tatus (Naiff *et al.*, 1986) e no solo, em associação com a monocultura de café (Silva-Vergara, 1996). A parede celular do fungo é composta, principalmente, por polissacarídeos, sendo que em leveduras alfa-glucana é o seu principal constituinte, havendo apenas traços de beta-glucana (Kanetsuna *et al.*, 1969; Kanetsuna *et al.*, 1972; Azuma *et al.*, 1974; San-Blas *et al.*, 1994). Já na parede do micélio, beta-glucana é a única glucana presente. Logo, a presença de alfa-glucana tem sido associada à virulência fúngica (Hogan & Klein, 1994).

A via natural de infecção na pcm é a pulmonar, ocorrendo através da inalação de micélios ou conídios que, sob estímulo da temperatura do corpo do hospedeiro, terão ativados alguns sistemas enzimáticos, responsáveis pela transformação da forma infectante - hifa - em forma patogênica - levedura (revisto por Brummer *et al.*, 1993; Kurokawa, *et al.*, 1998). Uma vez inalado pelo homem, o fungo poderá ser destruído ou multiplicar-se, dependendo de sua virulência, do tamanho do inóculo e da interação

deste com o sistema de defesa do hospedeiro. Poderá também se instalar por via hematogênica, em diferentes órgãos, e permanecer latente no interior de macrófagos teciduais, vindo a sofrer reativação, anos mais tarde.

Sabe-se que a paracoccidioidomicose ocorre mais freqüentemente em homens do que em mulheres, em uma proporção de 13:1 (revisto por Brummer *et al.*, 1993). Trabalhos mostram que os mecanismos que levam a essa diferença de manifestação da doença entre os sexos envolvem regulação hormonal. O tratamento do fungo com hormônios femininos, como estrogênio, bloqueia a transformação do micélio em levedura (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988), efeito que pode estar implicado na menor incidência da doença em mulheres (Aristizabal *et al.*, 1998).

2 - Defesa imunitária contra a infecção por *P. brasiliensis*

O estabelecimento da paracoccidioidomicose é dependente da virulência do agente infeccioso e da defesa imunitária do hospedeiro. O homem que se infecta com o fungo dispõe de um importante mecanismo da morte de leveduras, proporcionado por macrófagos ativados com IFN- γ (Brummer *et al.*, 1989). A atividade fungicida de macrófagos, otimizada pela ativação com IFN- γ , é atribuída principalmente à produção de óxido nítrico pela enzima NO sintase (iNOS), cuja atividade microbicida já foi demonstrada para diferentes agentes infecciosos, como *Leishmania major*, *Mycobacterium bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Shistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (Green *et al.*, 1990; Green & Nacy, 1993; Liew, 1993). A indução dessa enzima depende do sinergismo de ação de citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α , e de produtos liberados pelo próprio agente patogênico (Gonzáles *et al.*, 2000). Na infecção experimental por *P. brasiliensis*, há intensa produção de IFN- γ , TNF- α e NO, produção

esta que se correlaciona diretamente com a atividade fungicida dos macrófagos (Nathan, 1987). IFN- γ também estimula macrófagos infectados com o fungo a secretarem TNF- α , necessário para a manutenção de granulomas compactos (Souto *et al.*, 2000). IFN- γ quanto TNF- α conferem, portanto, resistência a *P. brasiliensis*, estimulando a formação de granulomas e a produção de NO, colaborando para o controle da infecção. Paradoxalmente, a produção aumentada de NO associa-se à supressão da resposta de células T específica para antígenos de *P. brasiliensis*, favorecendo o agravamento da lesão pulmonar da pcm (Bocca *et al.*, 1998). A produção aumentada de NO por macrófagos ativados na pcm experimental correlaciona-se também com queda da expressão do antígeno de superfície Ia em macrófagos e com depressão da resposta imunoproliferativa de células esplênicas (Bocca *et al.*, 1999). Esses fenômenos são inibidos pelo tratamento dos animais com L-arginina, que inibe a produção de NO (Bocca *et al.*, 1998).

Há indicações de que a liberação de NO (Bocca *et al.*, 1998) e a propriedade fungicida dos macrófagos (McEwen *et al.*, 1987) sejam atribuíveis não somente à ativação celular induzida por IFN- γ , mas também à ação de componentes do próprio fungo. Entretanto, há poucos estudos de identificação de componentes fúngicos que interfiram na produção de citocinas e/ou na atividade fungicida de células mononucleares. Atribui-se à β -glucana da parede de micélios uma intensa atividade indutora de inflamação, propiciadora da formação de granulomas, capaz de interferir na relação fungo-hospedeiro (Silva *et al.*, 1994; Figueiredo *et al.*, 1986; Figueiredo *et al.*, 1993.) Através da indução da produção de TNF- α , β -glucana associada a IFN- γ , incrementa a atividade fungicida de monócitos humanos (Anjos *et al.*, 2002), o que pode justificar a menor virulência de isolados de *P. brasiliensis* que contêm grandes quantidades de β -glucana. Em nosso laboratório verificou-se que um antígeno protéico

de *P. brasiliensis*, de 70 kDa e ligante de N-acetilglicosamina, denominado paracoccina, é dotado de propriedade indutora de liberação de NO por macrófagos murinos. A resposta a tal estímulo é intensa, dose-dependente e, aparentemente, não requer a atuação concomitante de IFN- γ (Gennari-Cardoso, 2000).

Na paracoccidioidomicose as respostas humoral e celular estão freqüentemente alteradas. A resposta humoral não é responsável pela resistência a *P. brasiliensis*; tanto pacientes (Bernard *et al.*, 1997) como camundongos susceptíveis infectados (Calich & Kashino, 1998) apresentam altos títulos de anticorpos séricos, atribuídos à ativação policlonal de linfócitos B, fenômeno característico da infecção crônica. Ela se associa a hipergamaglobulinemia, aumento dos níveis de complexos imunes circulantes e ativação do sistema complemento pela via clássica (Arango & Yarzabal, 1982; Munk *et al.*, 1992). Há altos níveis séricos de IgG, IgE e IgA (Arango & Yarzabal, 1982), diretamente correlacionados com a gravidade da doença.

Outra característica da infecção por *P. brasiliensis* é a depressão da resposta mediada por células T (Peraçoli *et al.*, 1982; Brummer *et al.*, 1993), atribuível a mecanismos como os relacionados a fatores séricos produzidos pelo hospedeiro (Costa *et al.*, 1983), anticorpos específicos (Castañeda, 1985), complexos imunes (Chequer-Bou-Habib *et al.*, 1989) e ação de células supressoras (Restrepo *et al.*, 1978, Arango & Yarzabal, 1982, Mota *et al.*, 1985, Sugizaki *et al.*, 1999). Como já referido, mais recentemente a depressão da imunidade mediada por células tem sido associada a altos níveis de produção de NO (Bocca *et al.*, 1998).

A disfunção imunológica, própria de pacientes com formas graves de pcm, manifesta-se, direta ou indiretamente, por supressão de resposta proliferativa de linfócitos frente a estímulos diversos, por falta de secreção de citocinas de padrão Th1 em resposta a antígenos de *P. brasiliensis*, pela não formação de granulomas compactos

capazes de restringir a disseminação do fungo e pela produção de grandes quantidades de anticorpos, sem ação protetora (Mamoni *et al.*, 2002).

O estabelecimento de respostas de tipo Th2, que se associam a formas progressivas de pcm, ou, alternativamente, de respostas Th1, que se relacionam com formas benignas da doença, depende fundamentalmente do padrão de citocinas secretadas pelas células do sistema imune. Quando ocorre a apresentação do antígeno para a célula T, no contexto de moléculas de MHC de classe II, por macrófagos e células dendríticas, estas células liberam IL-12 e induzem o desenvolvimento de células Th1, produtoras de IL-2 e IFN- γ . IL-2 provocará proliferação das células T, enquanto que IFN- γ estimulará macrófagos ativados a produzirem NO e outras substâncias microbicidas. Por outro lado, células Th2 serão preferencialmente ativadas a partir da apresentação de antígenos por linfócitos B, havendo produção de IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que estimulam linfócitos B a produzirem imunoglobulinas, que além de não serem protetoras, inibem as funções dos macrófagos e a diferenciação das células Th1 (Calich & Kashino, 1998).

Modelo experimental de infecção por *P. brasiliensis* em camundongos susceptível (B10.A) e resistente (A/Sn) tem permitido que se compreenda melhor o papel imunorregulador das citocinas na pcm (revisto por Calich & Kashino, 1998). Macrófagos de animais susceptíveis secretam altos níveis de TGF- β e baixos níveis de TNF- α , associados à baixa produção de IFN- γ e alta de IL-5 e IL-10; a produção de IL-2 e IL-4 é discreta e transitória. Nos camundongos resistentes, perfil oposto de secreção de citocinas foi observado, ocorrendo produção precoce de IFN- γ e IL-2, e, apenas tardiamente, de IL-4 e IL-5. Quando esses dois grupos foram depletados de IFN- γ , o camundongo A/Sn tornou-se susceptível e o B10.A aumentou sua susceptibilidade à infecção. Depleção de IL-4 não alterou o curso da doença em qualquer dos grupos de

animais. Administração de rIL-12 resultou, em ambos os grupos, em aumento da resistência à pcm. Esse conjunto de resultados sugere que a resistência à infecção por *P. brasiliensis* esteja associada à secreção de altos níveis de TNF- α e IFN- γ , seguida de produção contínua de IL-2 e IFN- γ ; por outro lado, a pcm progressiva, própria dos animais susceptíveis, associa-se à secreção pequena e efêmera de TNF- α e IFN- γ e à produção de IL-5, IL-10 e TGF- β (revisto por Calich & Kashino, 1998).

A resistência à infecção por *P. brasiliensis* é atribuível à imunidade celular e produção de IFN- γ . Pina e colaboradores (2004), porém, sugerem que a deficiência genética de IL-4 possa exercer papel protetor na paracoccidioidomicose pulmonar. Macrófagos alveolares de camundongos IL-4KO controlam o crescimento fúngico mais eficientemente do que camundongos selvagens e secretam maiores níveis de NO, associados a aumento dos níveis de IFN- γ nos pulmões. O mesmo grupo demonstrou que IL-4 pode exercer efeito variável na pcm, dependendo das características genéticas do hospedeiro (Arruda *et al.*, 2004). Camundongos C57Bl/6 (de susceptibilidade intermediária), quando depletados de IL-4 e infectados com leveduras de *P. brasiliensis*, apresentaram menor número de células fúngicas nos pulmões, menor produção de citocinas Th2, aumento dos níveis de IgG2a e diminuição dos níveis de IgG1, enquanto que camundongos B10.A (susceptíveis), submetidos ao mesmo procedimento, apresentaram aumento do número de células fúngicas nos pulmões.

A citocina IFN- γ exerce papel fundamental na potencialização de atividade fungistática e/ou fungicida de fagócitos, que são as células responsáveis pelas interações iniciais entre o fungo e o hospedeiro. Em modelos experimentais de pcm a primeira resposta no animal infectado com *P. brasiliensis* é o acúmulo de neutrófilos em sítios de localização de células fúngicas (Bedoya *et al.*, 1986; Iabuki & Montenegro, 1979, McEven *et al.*, 1987). A maioria dos estudos sobre o papel de neutrófilos na pcm

demonstra o exercício de importante atividade fungistática - e não fungicida - atividade que é potencializada por IFN- γ e que pode ser relevante na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis* (McEwen *et al.*, 1987; Restrepo & Velez, 1975; Kurita *et al.*, 1999). Fagócitos mononucleares não ativados são permissivos à multiplicação fúngica, fato manifesto pelo achado de leveduras intactas no fagossomos dessas células (Brummer *et al.*, 1990). A partir do estímulo com IFN- γ , entretanto, passam a ser dotados de potente atividade fungicida (Brummer *et al.*, 1988).

As leveduras fagocitadas perdem a integridade das mitocôndrias, há formação de vacúolos e desintegração do citoplasma, com desenvolvimento de células vazias de paredes intactas (Brummer *et al.*, 1990). Leveduras que escapam da destruição e persistem no hospedeiro suscitam uma resposta inflamatória que assume um padrão peculiar, chamada reação granulomatosa. Nela, o tipo celular predominante é o macrófago ativado, que pode assumir uma aparência modificada, similar a de uma célula epitelial (epitelióide). No granuloma, macrófagos, geralmente epitelióides, são circundados por um colar de leucócitos mononucleares, principalmente linfócitos, e às vezes, plasmócitos (Collins, 2000). As células epitelióides com certa frequência se fundem, formando células gigantes, no centro ou na periferia do granuloma. Os granulomas na pcm são numerosos e de tamanhos variáveis, podendo conter fungos degenerados, em quiescência, ou em reprodução ativa por brotamento múltiplo ou simples (Franco & Montenegro, 1982). O granuloma na pcm representa uma resposta eficiente do hospedeiro na tentativa de destruir e bloquear o parasita, prevenindo assim sua multiplicação e disseminação.

As características da resposta inflamatória, assim como o tipo de células envolvidas, permite a divisão da pcm em quatro estágios histopatológicos (Negroni, 1994): (1) estágio neutrofílico ou monocítico-neutrofílico, no qual predomina o influxo

de neutrófilos para o local onde estão as células fúngicas, essa reposta inicial dura de dois a três dias; (2) fase pregranulomatosa, que dura de sete a dez dias, é caracterizada por um aumento no influxo de linfócitos e macrófagos para a região; (3) fase granulomatosa, caracterizada pela formação de granulomas epitelióides compactos com alta carga fúngica central, circundada por células epitelióides e gigantes e um halo externo de linfócitos e plasmócitos; a região mais periférica é ocupada por fibroblastos e fibras de colágeno; (4) fase crônica, com granulomas altamente compactos, um número menor de células fúngicas e grau elevado de fibrose. Estudos indicam uma correlação positiva entre resposta imune celular elevada, restrição da infecção e números de células fúngicas no granuloma (Moschardi-Bacchi & Franco, 1985), mostrando que a resposta inflamatória gerada é importante para a contenção da disseminação do parasita.

3- Interações Lectina-Carboidrato e Reconhecimento Celular

Reconhecimento é um evento central em uma ampla gama de fenômenos biológicos e corresponde à primeira etapa de numerosos processos dependentes de interações célula-célula ou células-moléculas solúveis (revisto por Sharon & Lis, 1993). As células apresentam sua superfície recoberta de carboidratos, na forma de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos (Cook, 1986), cujas estruturas glicanas têm enorme potencial para codificar informações biológicas, já que um número limitado de monossacarídeos pode originar um grande número de diferentes compostos (Sharon & Lis, 1993). A idéia de que carboidratos de superfície pudessem desempenhar um papel importante no reconhecimento celular fez com que as lectinas, proteínas capazes de se ligar especificamente com açúcares, fossem consideradas candidatas a decodificadoras da informação biológica contida nos açúcares. Tal hipótese foi

explorada a partir do final da década de 70 (Ashwell & Morell, 1974; Harrison & Chesterton, 1980; Brandley & Schnaar, 1986; Sharon & Lis, 1993) sob estímulo de um quadro bastante favorável de conhecimentos acumulados sobre lectinas vegetais e que redundaram na constatação de que lectinas não estão confinadas a plantas, mas são ubíquas na natureza e encontradas, freqüentemente, em superfícies celulares e em partículas intracelulares. Constatou-se que lectinas medeiam o reconhecimento celular em muitos de sistemas biológicos, como inflamação, diferenciação celular, embriogênese, desenvolvimento, neoplasias e adesão de patógenos às células hospedeiras.

A primeira descrição de uma lectina foi feita por Peter Hermann Stillmark em 1888, ao estudar a toxicidade de sementes de *Ricinus communis* (mamona). A preparação obtida pelo pesquisador tinha a propriedade de aglutinar hemácias do sangue de animais de diferentes espécies e foi denominado ricina (revisto por Sharon & Lis, 2004). Substâncias com atividade aglutinante foram descritas em muitas outras plantas, sendo denominadas coletivamente de hemaglutininas. Em 1936, Sumner & Howell, após observarem que extratos de semente de *Canavalia ensiformis* aglutinavam eritrócitos de cavalo, purificaram e obtiveram pela primeira vez uma hemaglutinina pura, denominada concanavalina A. Esses pesquisadores verificaram que a sacarose inibia sua atividade hemaglutinante e sugeriram que a aglutinação induzida por concanavalina A ocorresse por reação com carboidratos da superfície eritrocitária (revisto por Sharon & Lis, 2004). No final da década de 40 verificou-se que algumas aglutininas eram específicas para diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO (Boyd & Reguera, 1949). A capacidade de distinguir eritrócitos de diferentes grupos sanguíneos levou Boyd & Shapleigh (1954) a denominarem lectina (do latim *legere*, que significa selecionar) todas as aglutininas de plantas açúcar-específicas. A definição

mais aceita de lectina é a proposta por Peumans & Van Damme, em 1995: “Lectinas são todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a um mono ou oligossacarídeo”.

A primeira demonstração da existência de lectinas em mamíferos foi feita por Ashwell & Morell, em 1974, ao demonstrarem a função de uma proteína hepática no clareamento de asialo-glicoproteínas séricas. Entretanto, a ampla aceitação da relevância das lectinas de mamíferos só ocorreu no início da década de 1990, após a descoberta das selectinas e a demonstração de seu papel crucial no *homing* de linfócitos e na migração inflamatória de leucócitos (Rosen, 1990; Bevilaqua *et al.*, 1991). A identificação de lectinas de mamíferos foi então feita por diversos grupos de pesquisa, com base não somente na sua capacidade de ligar-se especificamente a oligossacarídeos, mas também por possuírem uma sequência peptídica singular, identificada por Drickamer, em 1988.

A pesquisa contemporânea em lectinas caracteriza-se por rápido acúmulo de conhecimentos sobre ocorrência, estrutura, biossíntese e genética de lectinas, bem como pela busca de elucidar suas funções na natureza e de aplicar o conhecimento gerado com propósitos terapêuticos.

4- Galectina-3: interferência na resposta imune

Galectinas, antigamente chamadas de lectinas do tipo-S, constituem uma família de lectinas animais, solúveis, estruturalmente relacionadas e com afinidade por oligossacarídeos que contenham β -galactose (Leffler & Barondes, 1986; Barondes *et al.*, 1994). Trata-se de uma família de proteínas conservada evolutivamente; homólogos existem em mamíferos, aves, peixes, nematodas e esponjas (Kasai & Hirabayashi,

1996); em mamíferos, 14 membros já foram descritos até hoje (revisto por Almkvist & Karlsson, 2004).

Membros da família das galectinas apresentam um ou dois domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) de aproximadamente 130 aminoácidos. Com relação à sua estrutura, algumas galectinas contêm apenas um CRD e existem como monômeros (galectina-5, -7 e -10) ou dímeros (galectina-1, -2, -11, -13, -14), outras, como galectina-4, -6, -8, -9 e -12, apresentam dois CRD conectados por uma cadeia polipeptídica. Galectina-3, diferentemente dos outros membros da família, é uma proteína quimérica, com um CRD (C-terminal) e um domínio não lectínico (N-terminal), o qual contém repetições de uma sequência rica em prolina, glicina e tirosina, envolvida na oligomerização da proteína (revisto por Rubinstein *et al.*, 2004; Liu, 2000).

Galectina-3 (anteriormente chamada de antígeno Mac-2, $\square$ BP, L-29 ou CBP30/35) é um dos membros mais estudados da família. Tem peso molecular de aproximadamente 30kDa, é amplamente distribuída nos órgãos linfóides primários e secundários, bem como nas células do sistema imune, sendo encontrada no núcleo, citoplasma e na superfície dessas células. A expressão dessa lectina é aumentada durante a inflamação (Flotte *et al.*, 1983), proliferação (Agrwal *et al.*, 1989) e diferenciação celular (Liu *et al.*, 1995). Na superfície de macrófagos é conhecida como antígeno Mac-2, expresso em macrófagos elicitados com tioglicolato, mas não em macrófagos residentes (Ho & Springer, 1982). Galectina-3 é também encontrada em células do estroma tímico (Villa-Verde *et al.*, 2002), neutrófilos (Yamaoka *et al.*, 1995), eosinófilos (Truong *et al.*, 1993), células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer (Flotte, *et al.*, 1983) e células epiteliais (Perillo *et al.*, 1998). Galectina-3 é expressa em linfócitos T ativados, mas não em células T em repouso (Joo *et al.*, 2001);

bem como em linfócitos B ativados (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2004). A expressão de galectina-3 parece ser regulada de acordo com o estado de ativação das células (Sato & Hughes, 1994). Sua expressão em células tumorais tem levado a hipótese de que esteja envolvida na oncogênese e formação de metástase (Nakamura *et al.*, 1999; Melo, 2002). Galectina-3 está envolvida em uma variedade de processos inflamatórios, bem como no recrutamento de células para o local da infecção. Sano e colaboradores (2000) mostraram que essa lectina é quimioatraente para monócitos e macrófagos, capaz de induzir sua migração tanto *in vitro* como *in vivo*, sugerindo um importante papel para galectina-3 no recrutamento de células inflamatórias e APCs.

Galectinas citosólicas parecem não se utilizar da via clássica de secreção, através do retículo endoplasmático-Golgi, como faz a maioria das proteínas extracelulares solúveis presentes em eucariotos. Galectina-3 atinge a superfície celular por um processo ainda pouco entendido, no qual ela é concentrada em evaginações da membrana plasmática que se lançam para fora e liberam a galectina das vesículas externalizadas (revisto por Hughes, 2001). Essa rota secretória não-clássica evita que galectinas liguem-se a oligossacarídeos presentes nas proteínas em formação no complexo retículo-endoplasmático-Golgi (Rabinovich *et al.*, 2002). Outro possível mecanismo pelo qual galectina-3 citosólica atinge o meio extracelular seria pela necrose da célula, constituindo um processo passivo de secreção (revisto por Sato & Nieminen, 2004).

Galectina-3 localiza-se no núcleo de algumas células e pode ser funcionalmente importante na síntese de RNA, por ser um componente do complexo de processamento, juntamente com pré-RNA^m (Dagher *et al.*, 1995). Quando liberada para o meio extracelular e, após reconhecimento de seus ligantes na superfície da célula, galectina-3 pode sofrer mudanças conformacionais que resultam na sua oligomerização, através da

auto-organização da região N-terminal (Liu, 2000, Sato & Nieminen, 2004). A oligomerização resulta na formação de uma molécula de galectina-3 multivalente, com mais de um CRD, capaz de estabelecer *crosslinking* com glicoconjugados presentes na superfície das células, com conseqüente formação de *lattices* ou redes na superfície da célula. Dessa maneira, a galectina-3 multivalente modula a sinalização, a adesão célula-célula e/ou célula-matriz e a sobrevivência da célula (Rabinovich *et al.*, 2002, Sato & Nieminen, 2004).

Galectina-3 extracelular também tem sido implicada no crescimento e viabilidade celular (Akahani *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1996; Liu, 2000; Ochieng *et al.*, 2004). O papel da galectina-3 na promoção e regulação do crescimento e na proliferação celular é exercido sobre vários tipos celulares. Dados da literatura mostram que galectina-3 atua de maneira dualista podendo tanto proteger célula T contra apoptose como promover morte celular, dependendo de sua localização, interna (Yang *et al.*, 1996) ou externa à célula (Fukomori, *et al.*, 2003).

A despeito das indicações de multifuncionalidade da galectina-3, a geração de animais deficientes de galectina-3 não resultou em defeito fenotípico aparente (Hsu *et al.*, 2000). Tal fato sugere existir redundância de atividades entre os membros da família das galectinas, ou que elas estivessem envolvidas em processos pós-desenvolvimento, tais como a regulação da resposta imune e/ou resposta inflamatória. Um dos primeiros defeitos observados nos animais *knockout* para o gene da galectina-3 (gal-3KO) refere-se à resposta inflamatória. Quando estimulados por injeção intraperitoneal de tioglicolato, os animais gal-3 KO exsudam menor número de granulócitos na cavidade em comparação a animais selvagens (Hsu *et al.*, 2000). Como tal diferença só é demonstrável quatro dias após o estímulo, sugere-se que a galectina-3 interfira na resolução da inflamação (Colnot *et al.*, 1998). Hsu e colaboradores (2000)

demonstraram que animais destituídos do gene da galectina-3 apresentam resposta inflamatória peritoneal atenuada e macrófagos com morfologia alterada. Em um modelo murino de asma induzido por ovalbumina (OVA) foi observado recentemente que camundongos gal-3KO sensibilizados com OVA e depois desafiados com o mesmo antígeno desenvolvem inflamação mais discreta nas vias aéreas quando comparados aos animais WT sugerindo que galectina-3 desempenhe papel chave na inflamação das vias aéreas (Zuberi *et al.*, 2004).

Além da atividade em processos inflamatórios, estudos com animais deficientes de galectina-3 demonstram seu papel na modulação da produção de citocinas que podem atuar no direcionamento do eixo Th1/Th2 da imunidade. Cortegano e colaboradores (1998) mostraram que galectina-3 regula negativamente a produção de IL-5 por eosinófilos humanos. Zuberi e colaboradores (2004) observaram, em modelo murino de asma, que camundongos gal-3KO desenvolvem inflamação mais discreta nas vias aéreas e resposta Th1 amplificada, em comparação aos animais WT. Os autores postulam que a resposta Th1 de maior intensidade nos animais gal-3KO seja causada pela deficiente resposta Th2 desenvolvida pelos mesmos, o que indicaria que galectina-3 participaria no processo de regulação do eixo Th1/Th2.

Nosso grupo tem-se utilizado dos modelos murinos de infecção por *Toxoplasma gondii* ou por *Rhodococcus equi*, para avaliar o papel da galectina-3 na regulação da resposta imunitária. Ambos modelos experimentais têm em comum o desenvolvimento de uma resposta imune específica de padrão Th1, com a peculiaridade de que os camundongos (C57Bl/6) são resistentes à rodococose e sucumbem à toxoplasmose. Através desses estudos, demonstramos que animais gal-3KO, frente ao desafio com *T. gondii*, desenvolveram uma resposta inflamatória retardada paralelamente à montagem de uma resposta padrão Th1 amplificada, manifesta por maiores níveis séricos de IL-12

e IFN- γ em comparação aos animais WT. Apesar dessas diferenças, as taxas de sobrevivência à toxoplasmose foram similares entre camundongos gal-3KO e WT (Bernardes *et al.*, manuscrito submetido).

Camundongos gal-3KO desafiados com *Rhodococcus equi*, semelhante ao descrito na toxoplasmose, exibiram discreto infiltrado inflamatório e resposta padrão Th1 amplificada, em comparação a animais WT. Além disso, ao serem desafiados com uma dose letal, os camundongos gal-3KO foram mais resistentes à infecção, apresentando uma taxa de sobrevivência de 100% em contraposição à taxa de 20% de sobrevivência dos animais WT. Associa-se a essa resistência o fato dos animais gal-3KO, apesar da deficiência na fase inflamatória da resposta, desenvolverem uma resposta Th1 de maior intensidade que a desenvolvida pelos animais selvagens, com maior produção de IL-12 e IFN- γ (Ferraz e cols., manuscrito em preparação). Os dados obtidos nesses dois modelos experimentais demonstram, juntamente com os de outros grupos de pesquisa, a interferência da galectina-3 no eixo Th1/Th2 de resposta. Dessa forma, o estudo de animais deficientes para o gene da galectina-3, sob uma variedade de condições experimentais, pode colaborar para o entendimento do papel dessa lectina na regulação da resposta imune.

OBJETIVOS

Reunidas fortes sugestões de que a galectina-3 interfira no processo inflamatório, em particular na reação inflamatória granulomatosa, e conhecida a importância da formação de granulomas na evolução da infecção por *P. brasiliensis*, nosso trabalho propôs investigar o papel da galectina-3 no curso da paracoccidioidomicose experimental. Para isso, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar cineticamente a expressão tecidual de galectina-3 em camundongos selvagens, infectados com leveduras de *P. brasiliensis*.
2. Comparar o curso da infecção por *P. brasiliensis* em animais selvagens (WT) e geneticamente deficientes de galectina-3 (gal-3KO)

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 (WT), de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do biotério de criação de camundongos isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Além de animais selvagens, foram utilizados camundongos machos destituídos do gene da galectina-3 (Gal-3KO, *background* C57Bl/6), gerados no laboratório do Dr. Fu-Tong Liu (University of Califórnia, Davis, EUA) e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Roger Chammas (Faculdade de Medicina, USP, São Paulo).

2. Cultura de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para infecção dos camundongos foram utilizadas leveduras do isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18), obtidas a partir do cultivo do fungo em meio Fava-Netto por 7 a 14 dias, a 36°C. Esse isolado foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Roberto Martinez (Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP). A virulência dos isolados foi mantida através da inoculação periódica das leveduras em camundongos selvagens com posterior recuperação das mesmas em meio de cultura ágar-BHI. A escolha do isolado 18 foi baseada em sua alta virulência e capacidade de induzir reação granulomatosa (Kashino *et al.*, 1985).

3. Determinação de viabilidade dos fungos para infecção

A viabilidade foi determinada pela técnica de diacetato de fluoresceína - brometo de etídio (Calich *et al.*, 1979): 100µL de uma suspensão de leveduras em PBS estéril foram misturados a uma solução contendo 100µL de brometo de etídeo (50

mg/mL – Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) e 100µL de diacetato de fluoresceína (2µg/mL - Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA), preparadas no momento do uso. Essa suspensão foi incubada por 10 minutos a 36°C, na ausência de luz. Após o período de incubação, a viabilidade das células fúngicas foi determinada em microscópio de fluorescência, sendo que aquelas que apresentaram coloração esverdeada foram consideradas como formas vivas ou viáveis e aquelas que se mostraram avermelhadas foram consideradas mortas. Apenas as suspensões de leveduras com viabilidade superior a 80% foram utilizadas para infectar camundongos.

4. Componente antigênico utilizado como estímulo em ensaios *in vitro*

4.1: antígeno total de Pb18 (PbAg): Leveduras de Pb18 cultivadas conforme descrito no item 2 foram dissociadas em solução de PBS estéril contendo pérolas de vidro (4mm de diâmetro). O lisado foi obtido a partir do rompimento das células fúngicas por vibração ultrassônica a 200W, por 3 minutos, em banho de gelo. Esse procedimento foi repetido várias vezes, até se obter um alto grau de ruptura das leveduras, o qual foi verificado através da análise microscópica da suspensão fúngica. A suspensão foi centrifugada a 500 x g por 10 minutos e o sobrenadante retirado e filtrado. A dosagem protéica foi realizada pelo método de Bradford, conforme instruções do fabricante (Bio-Rad protein assay kit; Bio-Rad, Hercules, CA).

5. Infecção dos animais

5.1: infecção intraperitoneal

Cada camundongo foi inoculado intraperitonealmente com 5×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*, do isolado Pb18, contidas em 0,5mL de PBS. Após separação dos grumos por agitação mecânica com auxílio de pérolas de vidro (4mm de diâmetro), ou de

Vortex com 3 ciclos de 10 segundos, as leveduras foram lavadas com tampão fosfato estéril (PBS, pH 7,2) e ajustadas para uma concentração de 1×10^7 células/mL viáveis em PBS estéril.

5.2: infecção endovenosa

Cada camundongo foi inoculado endovenosamente com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*, do isolado Pb18, contidas em 0,1mL de PBS. As leveduras foram preparadas do mesmo modo descrito no item anterior e ajustadas para uma concentração de 1×10^7 leveduras/mL viáveis em PBS estéril.

6. Recuperação das leveduras

Animais infectados com *P. brasiliensis* foram sacrificados após 30 dias e fragmentos do pulmão e/ou fígado foram assepticamente retirados e pesados. Esses órgãos foram divulsionados em homogeneizador de tecidos (IKA[®]-Werke) em frascos apropriados contendo 1mL de PBS 1x estéril (pH 7,2). 100μL do macerado de cada um dos órgãos dos animais foram semeados, em duplicata, em placas de Petri contendo meio BHI-ágar enriquecido com 4% de soro bovino fetal inativado (Hyclone, Utah, USA) e 96μg/mL de gentamicina (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.). As placas foram vedadas com filme plástico para evitar a secagem e mantidas a 36°C, por até 14 dias, para o crescimento das colônias. A recuperação de fungo nos órgãos foi avaliada a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) aos 7 e 14 dias de cultivo; determinou-se o número de UFC por grama de órgão (UFC/g).

7. Avaliação cinética da expressão tecidual de galectina-3 em camundongos C57Bl/6 infectados com *P. brasiliensis*

7.1. Infecção de camundongos C57Bl/6 com leveduras de *P. brasiliensis*

A infecção foi realizada em 12 grupos de camundongos selvagens C57Bl/6, com 3 animais por grupo, a fim de verificar a expressão de galectina-3 nas fases iniciais (6 grupos) e tardias (6 grupos) da doença. A infecção foi feita por via intraperitoneal conforme descrito no item 5.1. Os animais dos 6 primeiros grupos foram sacrificados nos dias 3, 6, 9, 12, 15 e 18 após a infecção e os dos 6 grupos restantes foram sacrificados nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 49 após a infecção. Um grupo de 3 camundongos C57Bl/6 foi usado como controle; receberam 0,5mL de PBS, por via intraperitoneal, ao invés de serem infectados com leveduras, e foram sacrificados após 6 dias.

Os pulmões de todos esses animais foram colhidos para processamento de cortes histológicos.

7.2. Análise histopatológica das lesões

Após a morte e exposição das cavidades orgânicas dos camundongos, fragmentos do lobo direito pulmonar foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M e, após 24 horas, foram desidratados, clarificados em xilol, embebidos em parafina e seccionados (5µm). Os cortes foram mantidos em estufa a 60°C para fixação e, após desparafinização em xilol e reidratação em concentrações decrescentes de álcool, foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Os cortes foram utilizados para análise histológica, por microscopia de luz (Nikon, Eclipse E800) e as imagens foram adquiridas com o auxílio de uma câmera digital Nikon DXM1200 (Nikon Instruments, Inc.), acoplada ao microscópio. Fragmentos coletados de camundongos não infectados foram submetidos aos mesmos procedimentos, como controles. A análise das lâminas dos animais infectados ou não com o fungo foi realizada com o auxílio do patologista Prof. Dr. Marcello Franco (Escola Paulista de

Medicina – UNIFESP, São Paulo-SP). A formação de granulomas foi quantificada percorrendo-se todo o corte histológico (aumento de 10x), em uma escala arbitrária como sendo (-), para ausência de granulomas e/ou infiltrados celulares no corte analisado; (+), para uma incidência leve de granulomas, ou seja, com a presença de 1 a 2 granulomas por corte analisado; (++) , para uma incidência moderada, com a presença de 3 a 5 granulomas por corte e (+++), com um índice acentuado, ou seja, quando foram detectados mais de 5 granulomas por corte estudado.

7.3. Imunohistoquímica - detecção de galectina-3

Fragmentos do pulmão foram fixados do mesmo modo descrito no item 7.2 e cortes histológicos de 5µm de espessura foram feitos em lâminas de vidro silanizadas.

Para reação de imunohistoquímica, os cortes teciduais foram submetidos a desparafinização em xilol por 30 minutos, reidratação em sequência decrescente de álcool e submergidos por 5 minutos em água bidestilada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos (Perhidrol 30%, Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, o resgate dos sítios antigênicos foi feito em forno de microondas Sharp, em potência máxima (700 watts) (Shi *et al*, 1991). As lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01M, pH 6,0 e foram realizados 2 ciclos de 5 minutos e 2 ciclos de 4 minutos, com intervalo de 1 minuto entre os ciclos. Após aclimação à temperatura ambiente, as lâminas foram adicionadas à solução bloqueadora [soro de coelho 10% ou "Fc block" (FcγIII/II receptor; Pharmingen; 0,1mg/mL) diluídos em PBS + BSA 1%] por 1 hora, à temperatura ambiente.

Após três lavagens em PBS, as lâminas foram incubadas por 1:30 h com o anticorpo monoclonal rato anti-galectina-3 (M3/38 – gentilmente cedido pelo Prof. Dr.

Roger Chammas – Faculdade de Medicina, USP-SP) diluído em PBS-BSA 1% na proporção 1:50. Após novas lavagens com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (IgG de jumento anti-rato-HRP; Jackson Immuno Research, St. Louis, MO, USA) diluído em PBS-BSA 1% na proporção de 1:200, por 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas, após diversas lavagens, foram incubadas por 30 minutos com uma mistura de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB substrate kit, Pierce) e peróxido de hidrogênio a 3%. Seguiram-se desidratações em concentrações crescentes de álcool, contra-coloração com hematoxilina por 30 segundos e montagem em permount (Fischer, Nova Jersey, USA) para observação por microscopia de luz (Nikon, Eclipse E800). As imagens foram adquiridas com o auxílio de uma câmera digital Nikon DXM1200 (Nikon Instruments, Inc.), acoplada ao micsocópio. Como controle, foram desenvolvidas reações em tecidos de animais não infectados e na ausência dos anticorpos primário e secundário (controles da reação de imunohistoquímica).

8. Avaliação do curso da doença em animais geneticamente deficientes (gal-3KO) ou não (WT) para o gene da galectina-3

8.1. Infecção de camundongos WT e gal-3KO com leveduras de *P. brasiliensis*

A infecção foi realizada em grupos de 3 animais (gal-3KO e WT), por via intraperitoneal conforme descrito no item 5.1. Um outro grupo de 3 camundongos C57Bl/6 foi usado como controle; receberam 0,5mL de PBS por via intraperitoneal, ao invés de serem infectados com leveduras. Somente para a quantificação de UFC/g de órgão, os camundongos foram também infectados por via endovenosa, conforme descrito no item 5.2.

8.2. Análise histopatológica das lesões

Três animais de cada grupo (gal-3KO e WT) foram sacrificados por deslocamento cervical aos 15, 30 e 45 dias após infecção intraperitoneal. Fragmentos do fígado dos diversos grupos experimentais foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M e, após 24 horas, desidratados, clarificados em xilol, embebidos em parafina e seccionados (5µm). Os cortes foram mantidos em estufa a 60°C para fixação e, após reidratação em concentrações decrescentes de álcool, foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) ou uma coloração específica para fungos (Grocott) (Zdero *et al*, 1993). Os cortes foram utilizados para análise histológica, por microscopia de luz (Nikon, Eclipse E800) e as imagens foram adquiridas com o auxílio de uma câmera digital Nikon DXM1200 (Nikon Instruments, Inc.), acoplada ao microscópio. Fragmentos coletados de camundongos não infectados foram submetidos aos mesmos procedimentos, como controles. A análise das lâminas dos animais infectados ou não com o fungo foi realizada com o auxílio do patologista Prof. Dr. Marcello Franco (Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, São Paulo-SP).

8.3. Imunohistoquímica - detecção de galectina-3

Fragmentos de fígado foram fixados da maneira descrita no item 7.2 e cortes histológicos de 5µm de espessura foram feitos em lâminas de vidro silanizadas. O procedimento de imunohistoquímica foi realizado como descrito no item 7.3.

8.4. Morfometria dos granulomas teciduais

Os cortes histológicos do fígado de animais infectados, corados com H&E, foram analisados quanto a área dos granulomas e quanto a quantidade de granulomas/mm² de tecido. Estes foram observados em microscópio Carl Zeiss axiophot acoplado a uma câmara JVC TK1270 e ao computador, o qual possui o programa KS-400 v2.0. A objetiva utilizada neste procedimento foi de 10x, para todos os dias de infecção.

8.5. Produção de citocinas por células esplênicas de animais gal-3KO e WT infectados com *P. brasiliensis*

8.5.1. Obtenção de células esplênicas e estimulação *in vitro*

Grupos de três camundongos (gal-3KO e WT), com 7 dias de infecção intraperitoneal ou não infectados (controles), foram sacrificados; tiveram o baço removido assepticamente e divulsionado para a obtenção de células esplênicas totais. Essas células foram lavadas em meio RPMI 1640 incompleto (Sigma, St. Louis, MO, USA) por centrifugação a 250 x g a 4°C, por 10 minutos; seguiu-se lise de hemácias pela adição de 5mL de solução constituída de 9 partes de cloreto de amônio a 0,16 M e 1 parte de Tris-HCl a 0,17 M, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Foram adicionados 10mL de meio incompleto às suspensões celulares, que foram lavadas novamente por centrifugação a 250 x g por 10 minutos. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 2mL de meio RPMI completo (Sigma) [soro bovino fetal a 10% (Hyclone, Utah, USA), aminoácidos não essenciais (1/100) (Sigma), L-glutamina (0,04M) (Sigma) e gentamicina (50µg/mL) (Gibco)] e contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante vital Azul de Tripán a 0,2% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ). A concentração foi ajustada para 1x10⁷ células por mL de RPMI completo. Essas células (100µL) foram distribuídas em duplicata, em placas de cultura de 24 poços

(Corning, NY, USA) e cultivadas na presença de diferentes estímulos: LPS (5µg/mL) acrescido de IFN-γ (1,5 ng/mL), antígeno total de *P. brasiliensis* (5µg/mL, obtido conforme descrito no item 4) ou somente meio de cultura completo. As células foram mantidas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂. Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e armazenados a -80°C até o momento do uso para dosagem de citocinas pelo método de ELISA, utilizando o sistema OptEIA™:Mouse, de acordo com as instruções do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

8.5.2. Dosagem de IL-12 (p40 e p70), IFN-γ, IL-4, IL-10 e TNF-α

Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning, New York, USA) foram sensibilizadas com 100µL/poço de anticorpo monoclonais específicos para cada citocina a ser dosada (anticorpo de captura), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH9,6 por uma noite a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com solução tamponada com fosfato 0,6M, pH 7.2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween) e incubadas com uma solução de PBS acrescido com 10% de soro bovino fetal inativado (Sigma) (solução de bloqueio) durante 1 hora à temperatura ambiente. Aos poços das placas foram adicionados, em duplicata, as citocinas recombinantes (curva-padrão) e as amostras; as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida, foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween e foram adicionados os anticorpos secundários específicos para cada citocina conjugados com biotina (anticorpo de detecção) associados à avidina-peroxidase, na concentração recomendada pelo fabricante. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Após nova etapa de lavagem foi adicionado o revelador tetrametilbenzidina (TMB) (Pierce). As reações foram bloqueadas após 20 minutos com ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm em leitor de microplacas (Power Wave X- Bio Tek Instruments, Inc.).

8.6. Obtenção das amostras de soro de animais infectados

Animais (gal-3KO e WT) infectados intraperitonealmente tiveram seu sangue coletado por punção venosa, 30 dias após infecção. O soro foi obtido através da centrifugação do sangue total a 1000 x g por 5 minutos, sendo então congelado e armazenado à temperatura de -20°C, até o momento do uso.

8.7. Dosagem de anticorpos

Anticorpos específicos para os antígenos de *P. brasiliensis* foram quantificados no soro de animais infectados o fungo, através de ELISA. Placa de poliestireno de 96 poços (Corning, New York, USA) foi recoberta com 100µL/poço de antígeno total de *P. brasiliensis*, em uma concentração de 1µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6 por uma noite a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução tamponada com fosfato 0,6M, pH 7.2 contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma) (PBS-Tween) e incubada com 200µL/poço de uma solução de PBS-Tween acrescido de 3% de gelatina (PBS-T-gelatina3%), durante 1 hora, à 37°C. Aos poços da placa foram adicionados 100µL/poço das amostras dos soros dos animais infectados, coletados em diferentes períodos após infecção, em diferentes diluições (1/30 a 1/2430) em PBS-Tween acrescido de 1% de gelatina (PBS-T-gelatina 1%). A placa foi então incubada a 37°C durante 2 horas e, após cinco lavagens com PBS-Tween, foram adicionados os anticorpos de cabra anti-IgG1 e anti-IgG2b de camundongo conjugados à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluídos 1/5000 em PBS-T-gelatina 1%, por 1 hora, a temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de 100µL/poço de TMB (Pierce), na concentração sugerida pelo fabricante. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2M

e a leitura realizada a 450nm em leitor de microplacas (Power Wave X- Bio Tek Instruments, Inc.).

9. Análise estatística dos resultados

A determinação estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA), com o programa GraphPad InStat[®] versão 3.01, usando o teste Tukey. Valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Avaliação cinética da expressão tecidual de galectina-3 em camundongos C57Bl/6 (WT) infectados com *P. brasiliensis*

1.1. Histopatologia pulmonar

Foram estudados cortes, corados com hematoxilina-eosina, de pulmão de camundongos C57Bl/6, sacrificados nos dias 3, 6, 9, 12, 15 ou 18 após a infecção (para o estudo das fases iniciais da infecção por *P. brasiliensis*) ou nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 49 (para o estudo das fases tardias da infecção).

Com 3 e 6 dias de infecção, a histologia do pulmão dos camundongos não diferiram da verificada em animais não infectados com o fungo (figura 1A e tabela 1). Ao longo da infecção, a arquitetura dos septos alveolares foi modificada, com progressivo espessamento dos septos alveolares por infiltração de células inflamatórias e edema intersticial; esse quadro estava claramente definido aos 18 dias pós-infecção (figura 1B). Inflamação focal discreta era observada aos 9 dias (não mostrado) e, aos 15 dias pós-infecção, observavam-se no pulmão dos animais infectados a presença de pequenos granulomas, formados por focos de infiltrado histiocítico-neutrofílico (figura 2). Nesse período, porém, a frequência desses granulomas no tecido era baixa (tabela 1).

A partir dos 21 dias de infecção houve um aumento no número de granulomas encontrados no pulmão de animais infectados, constituídos de um maior número de células inflamatórias (tabela 1). Em torno dos 28 dias pós-infecção, é possível notar granulomas em maior número, tamanho maior e com maior densidade celular neutrofílica na periferia do granuloma (tabela 2 e figura 3), enquanto macrófagos eram encontrados no centro (figura 3). A partir dos 30 dias pós-infecção até o final da análise

histopatológica, o quadro de inflamação pulmonar, particularmente com relação à formação de granulomas, permaneceu sem alterações significativas.

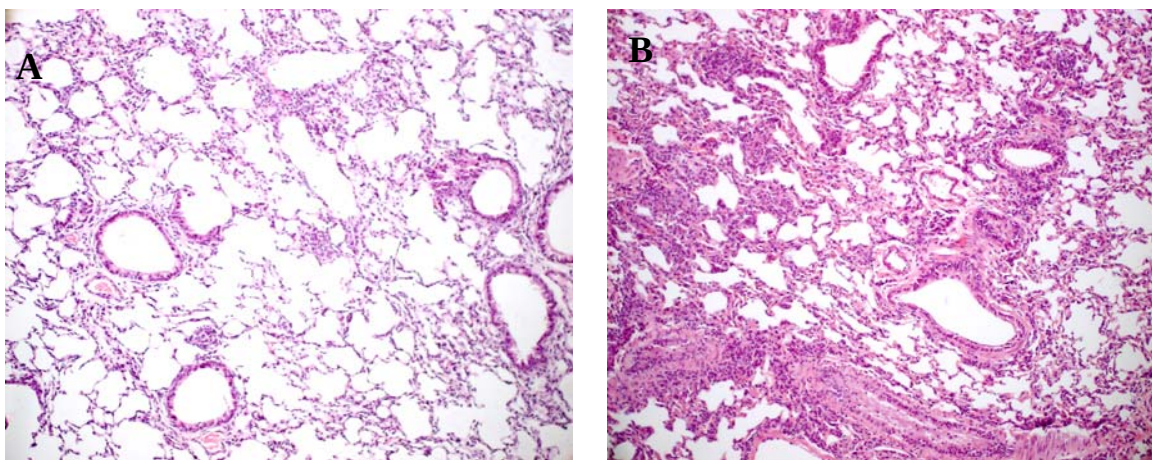


Figura 1: Corte histológico de pulmão de animais C57Bl/6 3 e 18 dias após infecção com *P. brasiliensis*. O painel A retrata o pulmão de animal com 3 dias de infecção, sem alterações aparentes nessa fase inicial. No painel B, corte de pulmão de camundongo após 18 dias de infecção, que mostra septos alveolares espessados, consequência do infiltrado difuso de células inflamatórias no local, e edema intersticial (H&E, objetiva 20X).

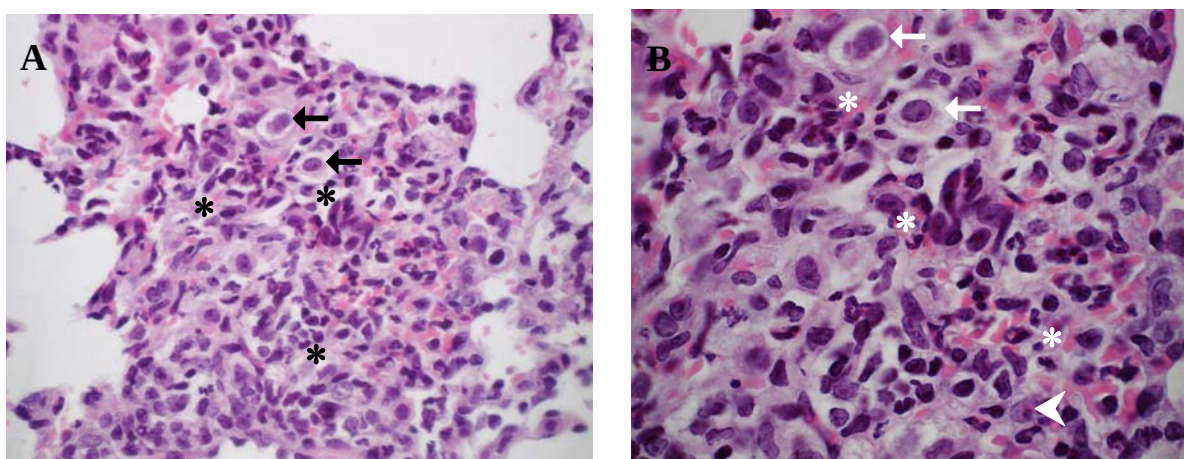


Figura 2: Granuloma presente no tecido pulmonar de camundongo C57Bl/6 15 dias após infecção por *P. brasiliensis*. No painel A, os asteriscos (*) indicam focos discretos de infiltrado neutrofílico, que se encontram principalmente ao redor do fungo, apontado pela seta (→) (H&E, objetiva 60X). Em B, o mesmo granuloma em maior aumento, asteriscos indicam infiltrado histiocítico-neutrofílico e a cabeça da seta (◄) aponta para macrófago (H&E, objetiva 100X).

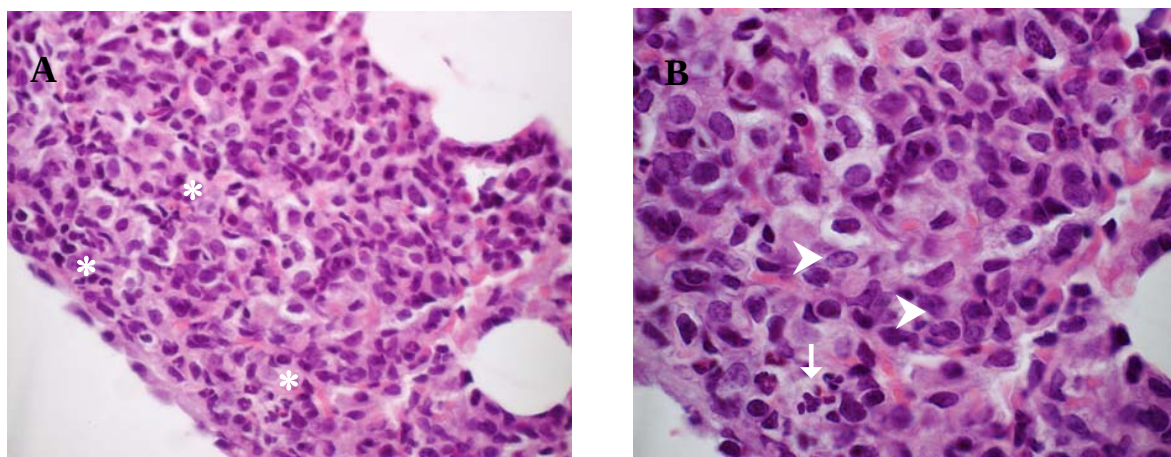


Figura 3: Granuloma presente no tecido pulmonar de camundongos C57Bl/6 28 dias após infecção por *P. brasiliensis*. Os cortes teciduais mostram granuloma com hiper celularidade histiocítica-neutrófila. No painel A, granuloma pulmonar onde asteriscos (*) mostram focos de neutrófilos (H&E, objetiva 60X). No painel B, o centro do mesmo granuloma, em maior aumento. As setas (→) indicam presença de neutrófilos na periferia e a cabeça da seta (➤) indica presença de macrófagos no centro (H&E, objetiva 100X).

Os resultados da análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. brasiliensis* estão sumarizados na tabela 1. Ao período próximo aos 30 dias de infecção encontrou-se um maior número de granulomas, situação que permaneceu inalterada por todo o período analisado.

Tabela 1: Análise histopatológica do pulmão de animais C57Bl/6 ao longo da infecção por *P. brasiliensis*

Dias	3	6	9	12	15	18	21	28	35	42	49
Granulomas	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

(-): ausente; (+): leve; (++) : moderado; (+++) : acentuado.

1.2. Detecção de galectina-3 no tecido pulmonar

Foram estudados cortes de pulmão de camundongos C57Bl/6, sacrificados 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 28 e 35 dias após infecção com a cepa Pb18 do *P. brasiliensis*.

A incubação dos cortes com anticorpo monoclonal anti-galectina-3 e, em seguida, com anticorpo secundário conjugado a peroxidase resultou na detecção, por microscopia de luz, de galectina-3 em células inflamatórias dos animais.

Expressão basal de galectina-3 é detectada em macrófagos alveolares de camundongos não infectados (controles) (figura 4A). Nesses animais, galectina-3 foi detectada no citoplasma dessas células, que estão dispersas em pequeno número pelo tecido (figura 4A). Com 3 dias de infecção foi possível detectar galectina-3 no citoplasma e núcleo de macrófagos alveolares, presentes em maior número no tecido pulmonar dos animais infectados (figura 4B); essa detecção foi muito próxima à basal, observada no animal não infectado. Aos 9 dias pós-infecção, galectina-3 era visualizada principalmente em macrófagos dos granulomas em formação, tanto no citoplasma como no núcleo (figura 5). O aumento no número de granulomas acompanhou-se de maior detecção de galectina-3. Com 18 dias de infecção galectina-3 era intensamente detectada em células macrofágicas situadas nos granulomas e ao redor dos fungos (figura 6). Com 28 dias, assim como com 35 dias, a detecção de galectina-3 permaneceu acentuada (tabela 2).

Reações negativas foram proporcionadas por cortes de animais infectados, incubados apenas com o anticorpo secundário-HRP (dado não mostrado).

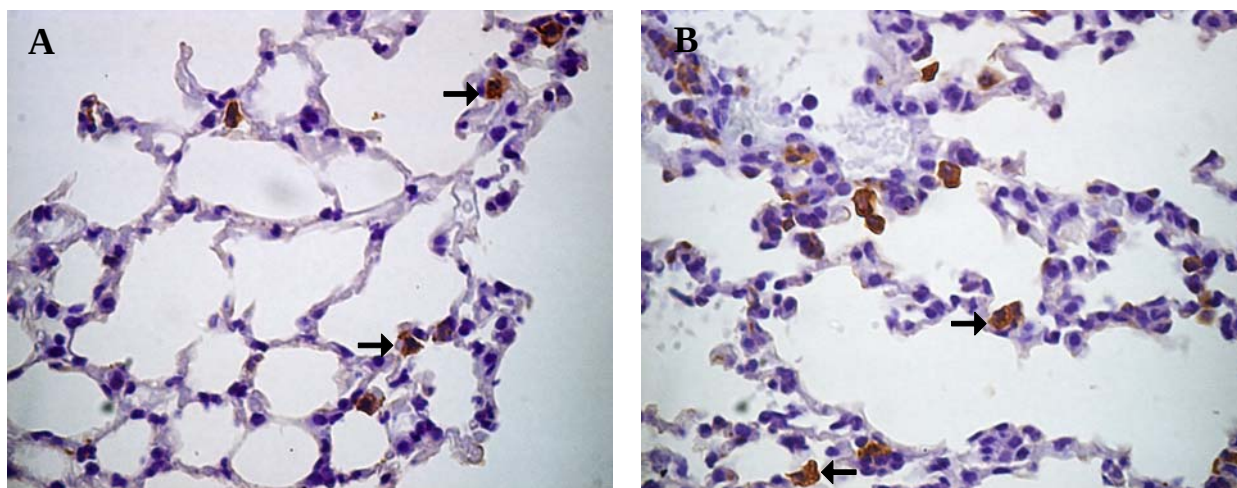


Figura 4: Detecção de galectina-3 em pulmão de camundongo C57Bl/6, não infectado com *P. brasiliensis* (controle) e após 3 dias de infecção com o fungo. No painel A, a seta (→) mostra detecção basal de galectina-3 nos macrófagos alveolares dos animais não infectados (objetiva 60X). Em B, a seta (→) mostra detecção de galectina-3 no citoplasma e núcleo dos macrófagos alveolares após 3 dias de infecção. A não ser pela maior frequência de macrófagos, a detecção de galectina-3 foi próxima à verificada no animal controle (objetiva 60X).

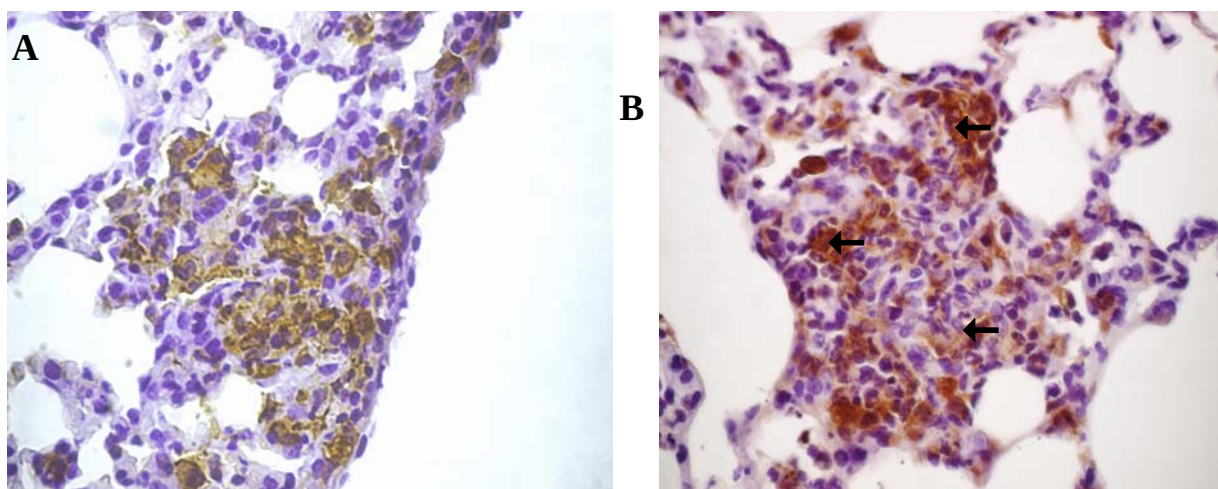


Figura 5: Detecção leve de galectina-3 em pulmão de camundongo C57Bl/6, após 9 dias de infecção por *P. brasiliensis*, com destaque para a área de granuloma em formação. Nesse período, nos poucos granulomas observados, foi possível detectar galectina-3 nas células inflamatórias que os constituem (painel A - objetiva 60X). No painel B, as setas (→) indicam detecção de galectina-3 no citoplasma e núcleo de macrófagos (objetiva 60X).

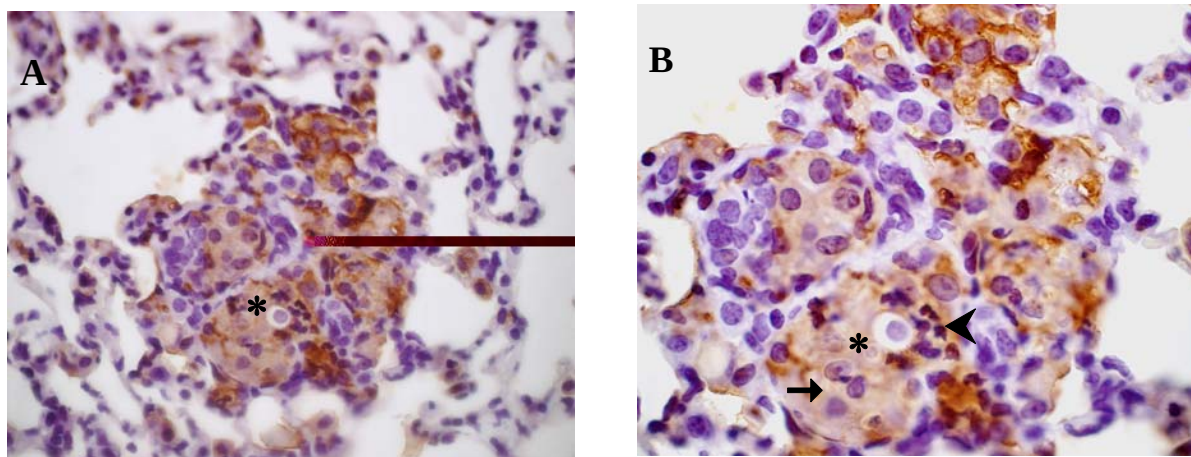


Figura 6: Detecção intensa de galectina-3 no pulmão de camundongos C57Bl/6, após 18 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Nesse período de infecção os granulomas encontram-se mais bem formados e, conseqüentemente, com um número maior de células inflamatórias expressando galectina-3. No painel A nota-se expressão de galectina-3 por macrófagos que se encontram ao redor do fungo (*) (objetiva 60X). Em B, em maior aumento, as setas (→) apontam para os macrófagos expressando galectina-3 e a cabeça da seta (◄) indica neutrófilos, ao redor de dois fungos (*) (objetiva 100X).

Os resultados da análise imunohistoquímica da expressão de galectina-3 em cortes teciduais dos pulmões de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. brasiliensis* estão sumarizados na tabela 2. Ela evidencia que a partir do 15º dia de infecção a expressão da lectina permanece em um padrão elevado e constante; observe-se que esse mesmo tempo de infecção marcou a ocorrência de maior reação granulomatosa pulmonar (tabela 1).

Tabela 2: Análise imunohistoquímica do pulmão de animais C57Bl/6 ao longo da infecção por *P. brasiliensis*

Dias	3	6	9	12	15	18	21	28	35
Detecção de galectina-3	+/-	+/-	+	+	++	+++	+++	+++	+++

(+/-): detecção próxima à verificada no pulmão de camundongos não infectados; (+): leve; (++) moderado; (+++): acentuado.

2. Avaliação do curso da infecção por *P. brasiliensis* em animais geneticamente deficientes para o gene de galectina-3 (gal-3KO)

2.1 Histopatologia das lesões hepáticas:

Em nosso modelo experimental, as principais diferenças com relação à resposta inflamatória entre os animais gal-3KO e WT foram observadas no fígado. Portanto, foram estudados cortes de tecidos obtidos de camundongos gal-3KO e WT sacrificados 15, 30 e 45 dias após infecção com *P. brasiliensis*. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz. Com 15 dias de infecção já era possível notar diferenças entre os cortes histológicos de animais WT e gal-3KO; nestes havia um menor número de granulomas do que em animais WT (figura 8A e B). Aos 30 dias de infecção, granulomas bem formados eram visualizados nos animais WT (figura 9), enquanto nos gal-3KO os granulomas eram poucos e discretos (figura 10). Após 45 dias de infecção, granulomas de limites definidos e bem organizados estavam presentes no tecido hepático do animal WT (figura 11), com a presença de neutrófilos circundando o granuloma e o centro constituído principalmente de fungos e macrófagos modificados (células epitelióides) (figura 12). No mesmo período de infecção animais gal-3KO apresentavam um número menor de granulomas hepáticos, de limites pouco

definidos e menor densidade celular (figura 13). Tecido hepático de camundongos não infectados apresentava-se com aspecto normal, sem infiltrados inflamatórios (figura 14).

2.2. Morfometria dos granulomas no fígado de animais infectados com *P. brasiliensis*

Confirmando a análise histopatológica, a análise morfométrica mostrou que o número de granulomas/mm² de tecido hepático dos animais WT é maior do que o dos animais gal-3KO, diferença acentuada no decorrer do processo infeccioso (figura 15A). Nos animais WT observou-se, com o decorrer da infecção, um aumento no número de granulomas/mm²: aos 15 dias de infecção esses animais apresentam em média 3 granulomas/mm²; aos 30 dias esse número sobe para 4,6 e aos 45 dias após a infecção esses animais apresentam aproximadamente 5 granulomas/mm². Nos animais gal-3KO aumento no número de granulomas/mm² é muito discreto: encontraram-se aos 15 dias 1,8 granulomas/mm² e no restante do período, 2,5 granulomas/mm² (figura 15A).

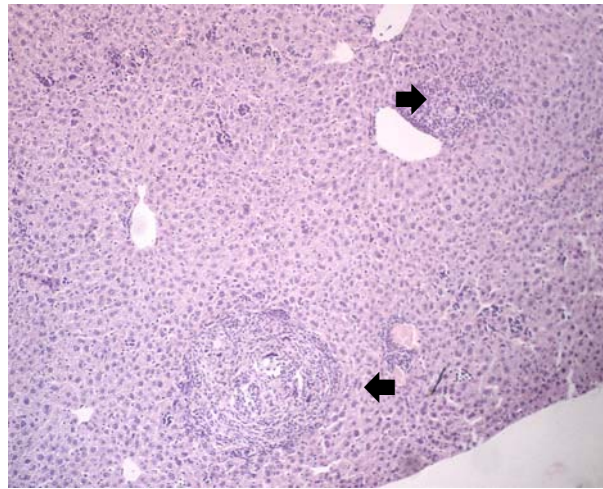


Figura 8A: Fígado de animal WT aos 15 dias de infecção por *P. brasiliensis*. A seta (➡) aponta para granulomas, em formação, que são visualizados no fígado de animal WT (H&E, objetiva 10X).

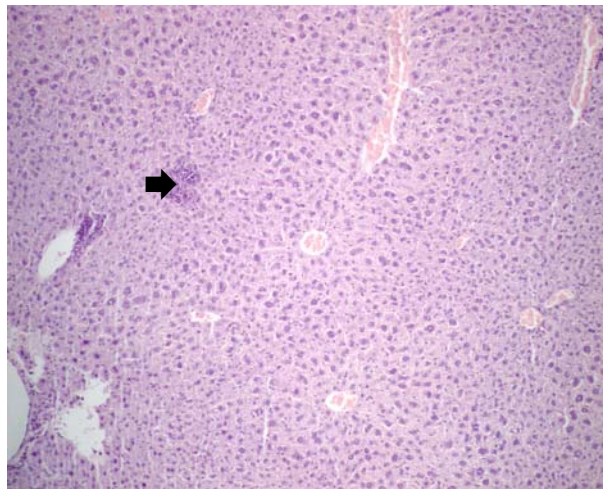


Figura 8B: Fígado de animal gal-3KO aos 15 dias de infecção por *P. brasiliensis*. A figura mostra secção de fígado de animal gal-3KO, com raros granulomas, como o apontado pela seta (➡) (H&E, objetiva 10X).

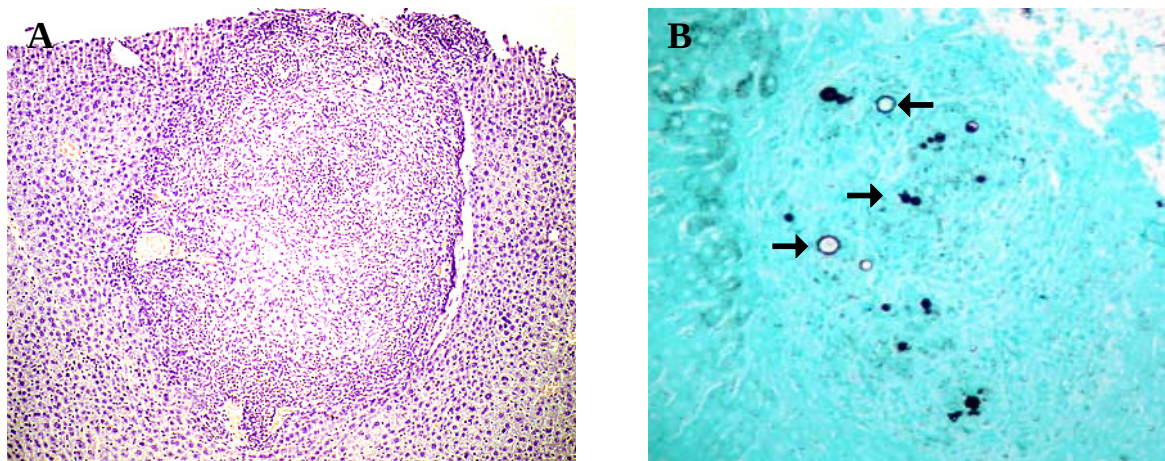


Figura 9: Fígado de camundongo WT aos 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Granuloma extenso e de limites definidos, corado por H&E (painel A, objetiva 10X). A coloração de Grocott destaca as leveduras, indicadas pela seta (→), no interior do granuloma formado (painel B, objetiva 10X).

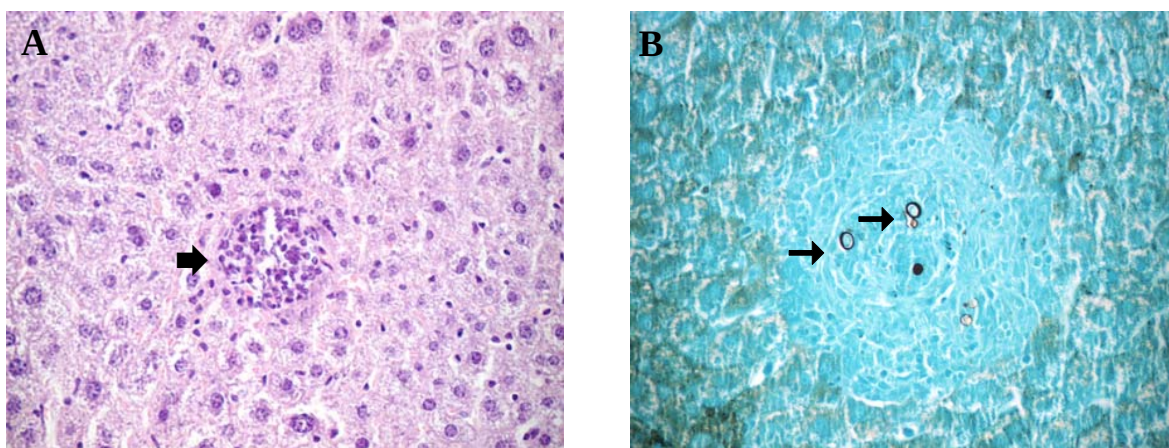


Figura 10: Fígado de camundongo gal-3KO aos 30 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Observa-se discreto granuloma (➡) no tecido hepático de camundongo gal-3KO (painel A, H&E, objetiva 40X). A coloração de Grocott destaca a presença de leveduras (→) no granuloma (painel B, objetiva 40X).

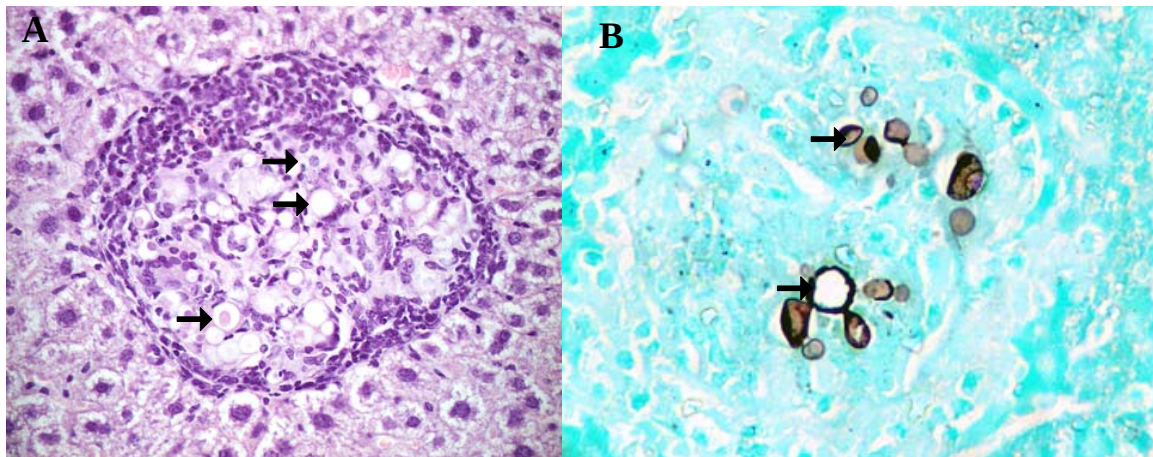


Figura 11: Fígado de camundongo WT aos 45 dias de infecção: granuloma intra-hepático. Granuloma de limites definidos, corado por H&E (painel A, objetiva 40X). A coloração de Grocott destaca a presença de leveduras no interior do granuloma, apontadas pelas setas (→) (painel B, objetiva 40X).

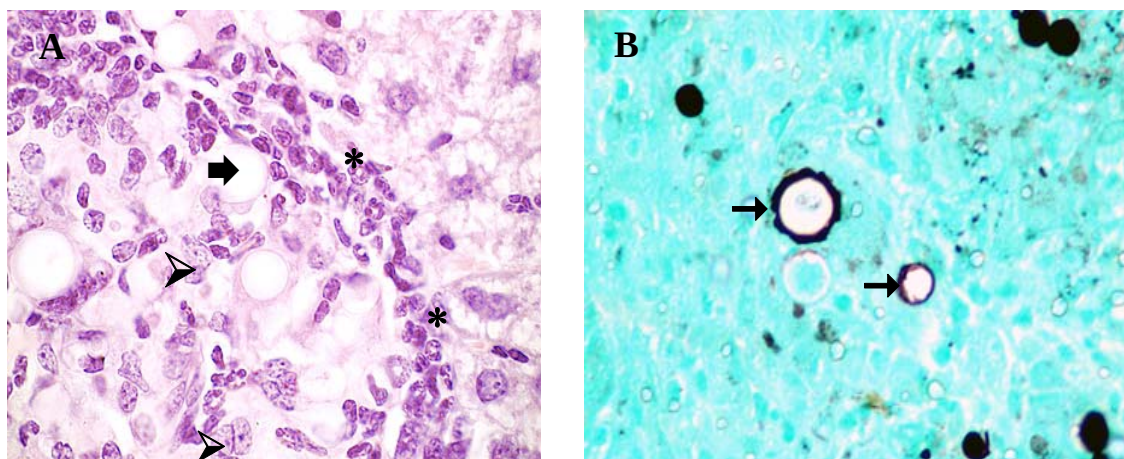


Figura 12: Fígado de camundongo WT aos 45 dias de infecção por *P. brasiliensis*: células inflamatórias constituintes de granuloma intra-hepático. O maior aumento permite observar neutrófilos (*) circundando o granuloma, assim como fungos (→) e macrófagos epitelióides (➤) no centro do granuloma (painel A, H&E, objetiva 100X). A coloração de Grocott destaca a presença de leveduras no granuloma (→) (painel B, objetiva 100X).

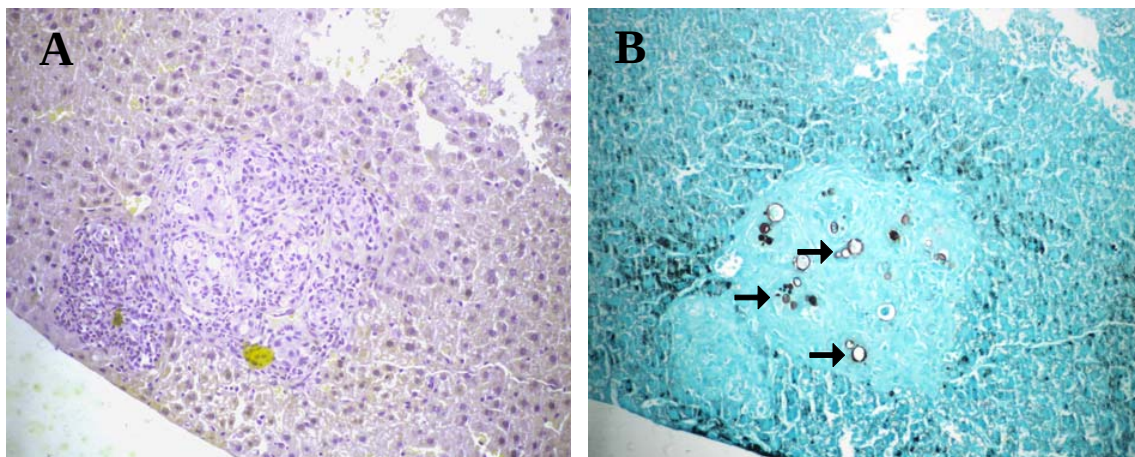


Figura 13: Fígado de camundongo gal-3KO aos 45 dias de infecção por *P. brasiliensis*. Granuloma intra-hepático de limites pouco definidos (painel A, H&E, objetiva 20X). A coloração de Grocott destaca a presença de leveduras no interior do granuloma (painel B, objetiva 20X).

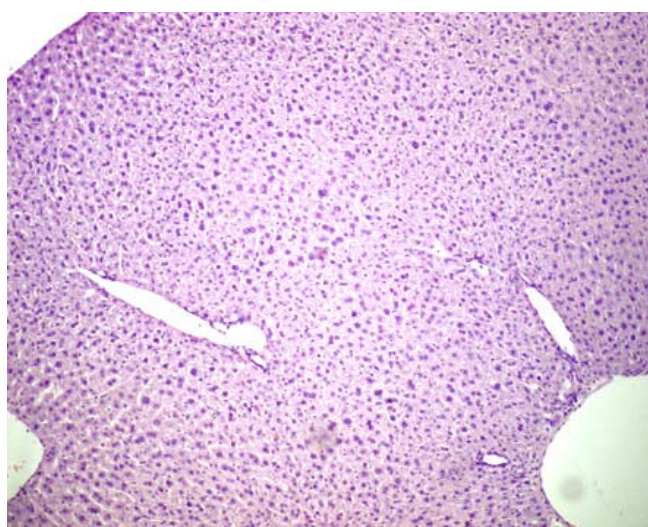


Figura 14: Fígado de camundongo C57Bl/6 não infectado. Arquitetura preservada e ausência de infiltrado inflamatório em animal não infectado com a cepa Pb 18 de *P. brasiliensis* (H&E, objetiva 10X).

Os granulomas presentes no animal WT, além de estarem presentes em maior número, possuem, em média, uma área maior (figura 15B).

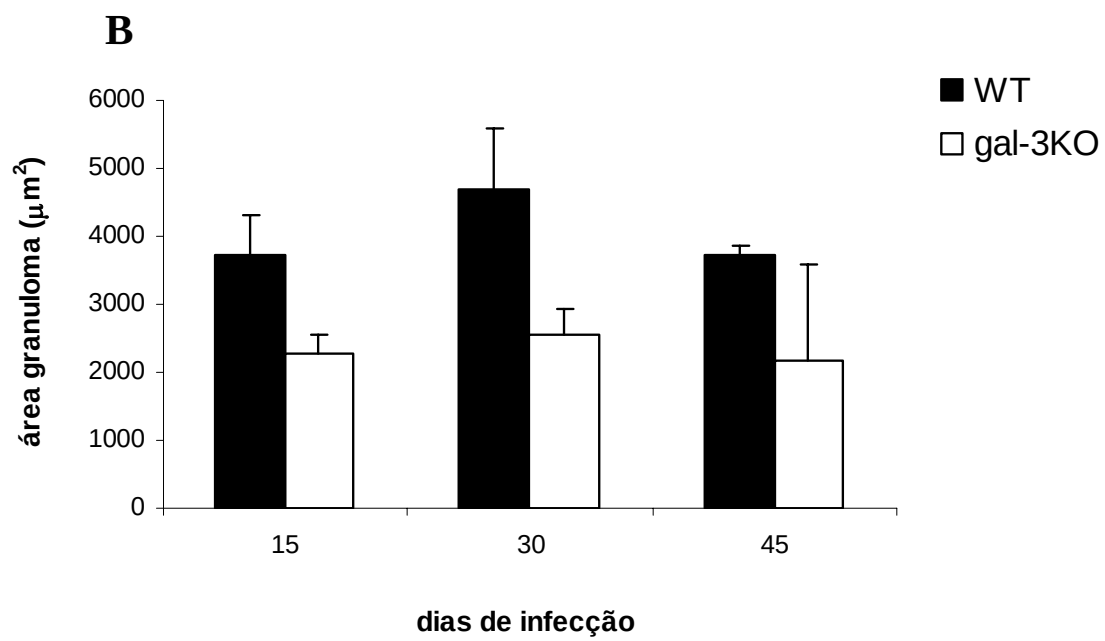
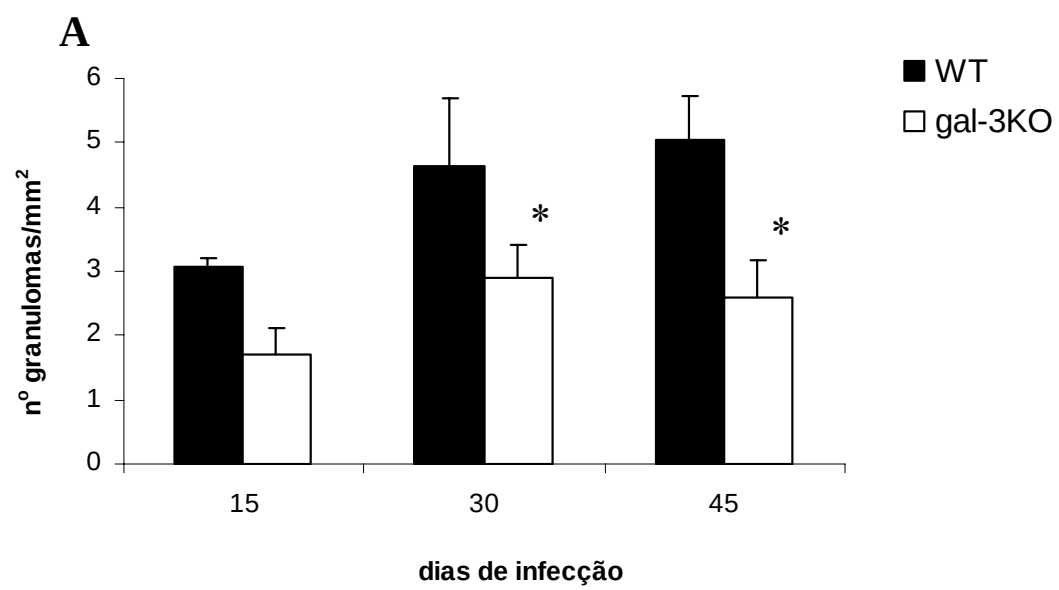
2.3. Expressão de galectina-3 no fígado de camundongos gal-3KO e WT

Foram estudados cortes de fígado, fixados em paraformaldeído 4%, de camundongos gal-3KO e WT sacrificados 15, 30 e 45 dias após infecção com a cepa Pb18 do *P. brasiliensis*. A incubação das lâminas com anticorpo monoclonal anti-galectina-3 e, posteriormente, com anticorpo secundário conjugado a peroxidase revelou, por microscopia de luz, expressão de galectina-3 em células inflamatórias dos animais selvagens.

A expressão de galectina-3 foi evidente em todo o período analisado, uma vez que o influxo de células inflamatórias ocorreu já aos 15 dias de infecção e permaneceu por todo o período analisado nos animais WT. Com 15 dias de infecção o animal selvagem já apresentava alguns granulomas nos quais era possível detectar galectina-3 (figura 16A); após 30 dias de infecção a detecção de galectina-3 é intensa nas células inflamatórias que constituem os granulomas (figura 16B). Galectina-3 é detectada em células organizadas formando o granuloma, principalmente ao redor das leveduras (figura 17).

Tecidos provenientes de animais gal-3KO no mesmo período de infecção referido para os animais WT não proporcionaram, como esperado, marcação por anticorpo anti-galectina-3 (figura 18).

Figura 15: Morfometria das secções de fígado de camundongos WT e gal-3KO infectados com *P. brasiliensis*. As barras representam o número de granulomas encontrados por mm^2 (A) e a área desses granulomas em μm^2 (B) presentes no tecido hepático dos animais WT (barras pretas) ou gal-3KO (barras brancas). Camundongos não infectados apresentaram características histológicas de fígado normal e serviram como referencial de estrutura do órgão. Os cortes foram analisados em microscópio Carl Zeiss Axiophot acoplado a uma câmara JVC TK 1270 e ao computador e os valores foram conseguidos com o uso do programa de imagens KS400 v2.0. As barras representam a média $\pm$ SD de cortes de fígados provenientes de 3 animais distintos. *: $p < 0,05$ é significativo em relação os animais selvagens no mesmo período de infecção.



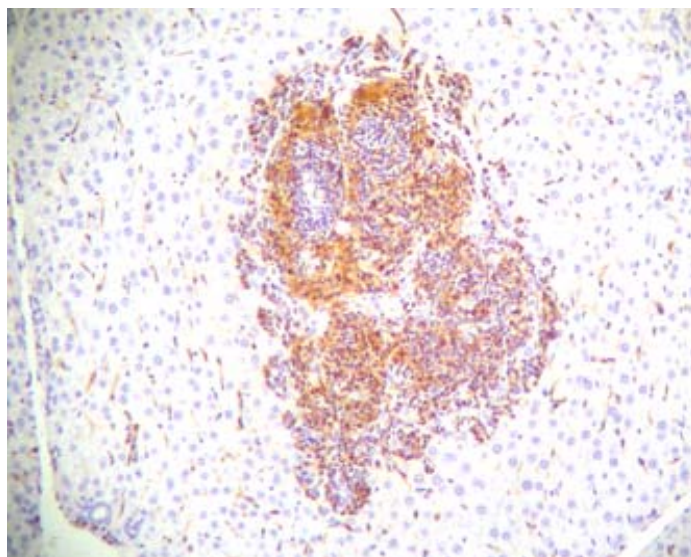


Figura 16A: Detecção de galectina-3 no fígado de camundongo WT aos 15 dias de infecção. Nota-se a marcação de galectina-3 pelo anticorpo monoclonal específico (M3/38 - IgG de rato anti-galectina-3) nas células constituintes de granuloma intra-hepático (objetiva 10X).

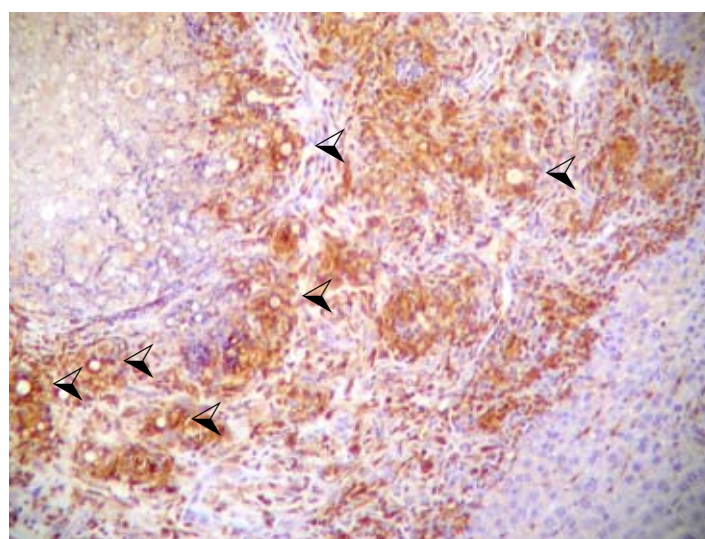


Figura 16B: Detecção de galectina-3 no fígado de camundongo WT aos 30 dias de infecção. Galectina-3 é marcada em células inflamatórias que constituem o granuloma, predominando ao redor de células fúngicas, que estão identificadas pela cabeça da seta (➤) (objetiva 40X).

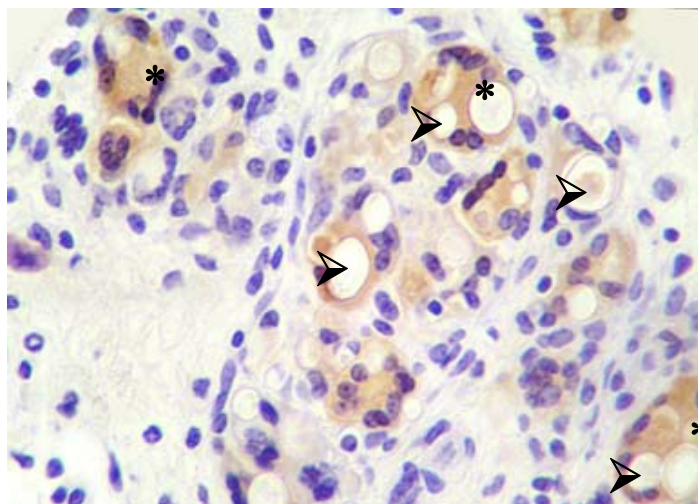


Figura 17: Detecção de galectina-3 no fígado de camundongo WT aos 45 dias de infecção. A cabeça da seta (➤) aponta para leveduras, margeadas por células inflamatórias que expressam galectina-3 (*) (objetiva 40X).

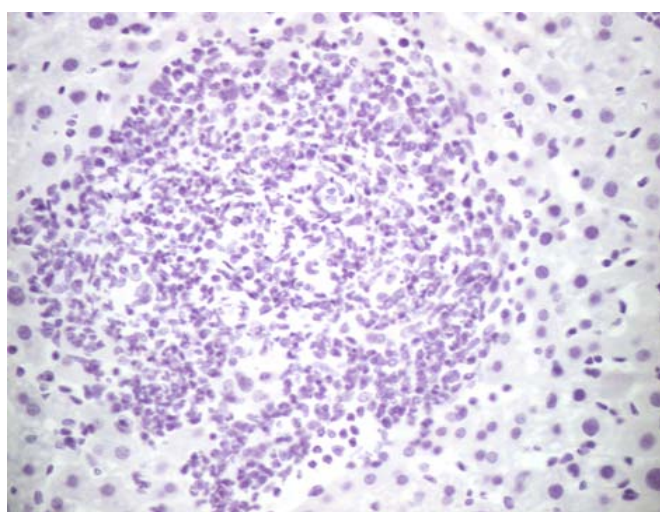


Figura 18: Fígado de camundongo gal-3KO aos 30 dias de infecção. Ausência de marcação pelo anticorpo monoclonal anti-galectina-3 em granuloma intra-hepático (objetiva 40X).

2.4. Recuperação de leveduras dos órgãos provenientes de animais gal-3KO e WT infectados

Após verificar que o animal deficiente de galectina-3 apresentava menor resposta inflamatória tecidual frente à infecção por leveduras do que o camundongo selvagem, passamos a avaliar a repercussão da ausência de galectina-3 sobre a eliminação de leveduras no pulmão e fígado, aos 30 dias de infecção. Recuperou-se quantidade significativamente superior (17 vezes) de CFU do tecido pulmonar de animais gal-3KO do que de WT (tabela 3). A recuperação de CFU do tecido hepático foi inferior à do tecido pulmonar, sem diferença significativa entre gal-3KO e WT (tabela 3).

O mesmo procedimento foi realizado após infectar os animais por via endovenosa. A diferença de recuperação entre os tecidos pulmonar e hepático se acentuou, com contagens de CFU no pulmão em média 200 vezes superior à verificada no fígado (tabela 3). A quantidade de CFU recuperada do pulmão de animais gal-3KO foi significativamente superior a de animais WT, reproduzindo, em diferente escala, o resultado verificado com a infecção intraperitoneal.

2.5. Produção de citocinas por células esplênicas de animais gal-3KO e WT infectados ou não com *P. brasiliensis*.

Investigou-se se o curso desfavorável da paracoccidiodomicose experimental em camundongos gal-3KO seria atribuível ao padrão de citocinas produzidas por células desses animais. Para tanto, cultivamos células esplênicas de camundongos gal-3KO e WT, coletadas aos 7 dias de infecção ou coletadas de animais não infectados; submetemos as células a diferentes estímulos, por 48 e 96 horas, e determinamos a concentração de citocinas no sobrenadante de cultura.

Com relação à IL-12p40, concentrações significativamente superiores foram produzidas por células esplênicas de camundongos gal-3KO infectados com *P. brasiliensis* do que por células de camundongos WT, frente ao estímulo com antígeno fúngico ou com LPS associado a IFN- γ , bem como na ausência de estímulo (figura 19A). Nessa última condição, células de animais gal-3KO infectados produziram 10 vezes mais IL-12p40 do que as células dos animais WT.

Com relação à produção de IFN- γ células de animais gal-3KO e WT infectados produziram níveis semelhantes de IFN- γ frente ao estímulo com antígeno fúngico (PbAg) ou ao estímulo inespecífico (LPS/IFN- γ) (figura 20B). Na ausência de estímulo, células esplênicas dos animais WT produzem quantidades significativamente maiores de IFN- γ do que as células dos animais gal-3KO.

Esses intrigantes resultados nos levaram a avaliar se a maior produção de IL-12 verificada em camundongos gal-3KO infectados refletiria uma propriedade intrínseca dessas células, apenas acentuada pela infecção fúngica. Conforme mostra a figura 20A células esplênicas provenientes de camundongos não infectados produzem mais IL-12 quando coletadas de gal-3KO do que de WT, tanto em resposta a antígeno fúngico (PbAg) como em resposta a LPS e IFN- γ .

A produção de IFN- γ , ainda que surpreendentemente não fosse diferente entre as células estimuladas dos animais gal-3KO e WT infectados, também foi avaliada em células esplênicas de camundongos não infectados. Apenas o estímulo com LPS/IFN- γ em células de animais gal-3KO foi capaz de resultar em níveis de IFN- γ significativamente mais altos do que os detectados na ausência de estímulos (figura 20B).

As citocinas IL-12 (p70), IL-4 e TNF- α não estavam presentes em níveis detectáveis no sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais infectados e IL-10 foi

encontrada em concentrações baixas e similares para ambos os grupos, nos mesmos sobrenadantes (dados não mostrados).

2.6. Avaliação da resposta imune humoral: dosagem de IgG1 e IgG2b no soro de animais gal-3KO e WT infectados com *P. brasiliensis*

Uma vez que detectamos variações na produção de citocinas por células do baço dos animais dos diferentes grupos, procuramos acessar outros parâmetros para avaliação do padrão de resposta imune montado por animais selvagens e deficientes de galectina-3, infectados por *P. brasiliensis*. Medimos os níveis séricos de IgG1 (característico de um padrão Th2 de resposta) e de IgG2b (característico de um padrão Th1) específicos para o fungo, produzidos pelos animais infectados.

Camundongos WT apresentaram baixos títulos de anticorpos séricos de ambos isotipos, enquanto o soro de camundongos gal-3KO proporcionou leituras no ELISA de detecção de IgG1 que foram, em média, 9 vezes superiores às de camundongos WT (0,36 vs 0,04) (figura 21). IgG2b também foi detectada em níveis baixos, próximos aos detectados em camundongos WT.

Tabela 3: Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de órgão de animais gal-3KO e WT infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos foram infectados por via intraperitoneal e endovenosa com 5×10^6 e com 1×10^6 leveduras/animal, respectivamente. Após 30 dias, o pulmão e o fígado foram retirados, pesados, homogeneizados e plaqueados em meio BHI-ágar. Decorridos 14 dias de incubação, os valores de UFC/g de órgão foram determinados, onde a média é representativa de 3 a 4 camundongos.

** : $p < 0,01$: muito significativo em relação aos animais WT

*** : $p < 0,001$: extremamente significativo em relação aos animais WT.

	PULMÃO		FÍGADO	
	KO	WT	KO	WT
Infecção i.p.	$8,5 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3^{**}$	$0,5 \times 10^3 \pm 0,12 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$	$0,4 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$
Infecção i.v.	$5,5 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^4^{***}$	$3,7 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$	$0,3 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^3 \pm 0,08 \times 10^3$

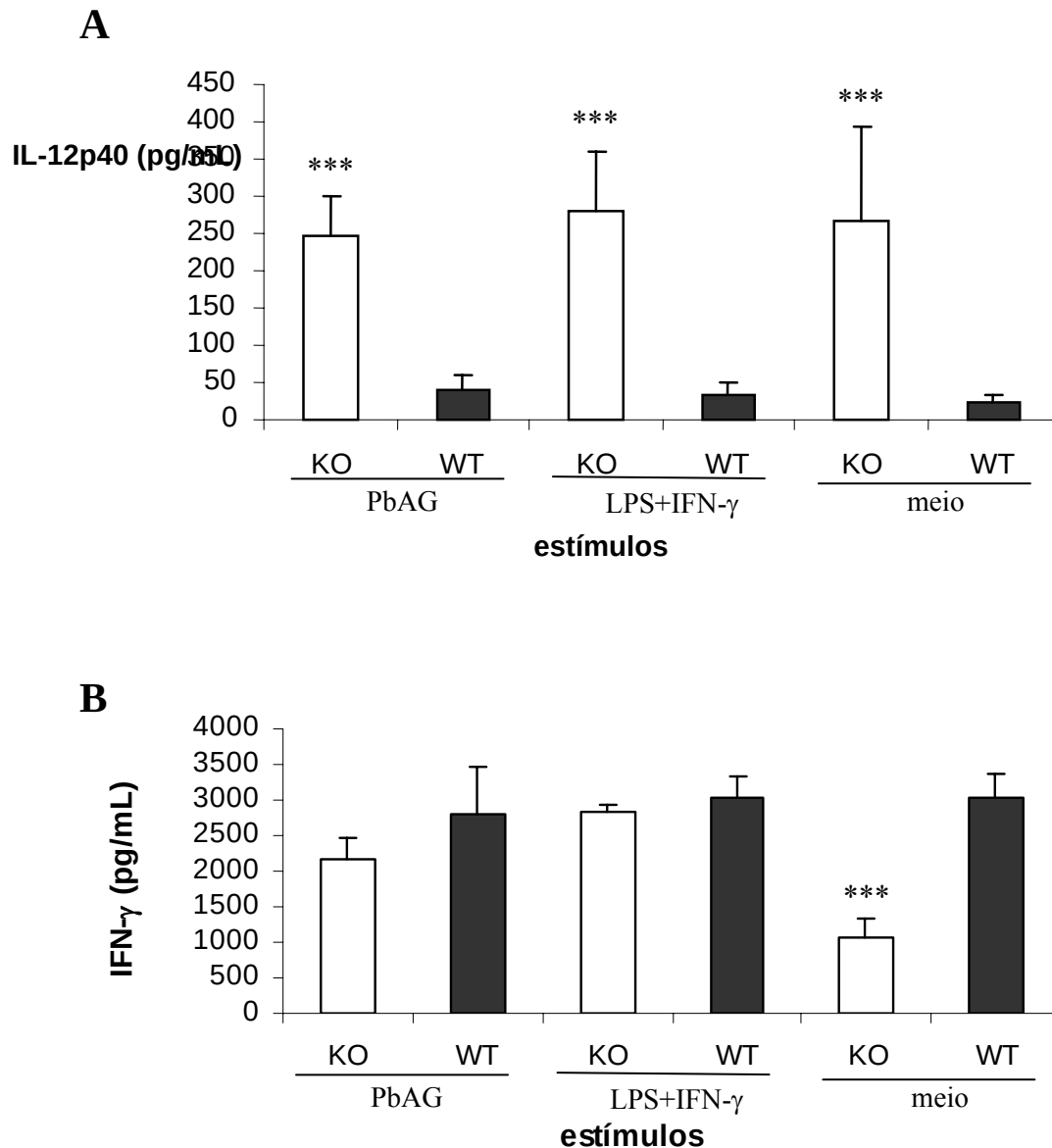


Figura 19: Produção de IL-12 p40 (A) e IFN-γ (B) por células esplênicas de animais gal-3KO e WT infectados com *P. brasiliensis*. Células esplênicas de camundongos gal-3KO e WT, após 7 dias de infecção, foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e incubadas por 48 e 96 horas apenas com meio de cultura ou meio adicionado de diferentes estímulos: antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg - $5 \mu\text{g/mL}$) ou LPS ($5 \mu\text{g/mL}$) e IFN-γ ($1,5 \text{ ng/mL}$). Os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas por ELISA. Cada barra representa a média $\pm$ SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos feitos em duplicata. ***: $p < 0,001$: extremamente significativo em relação aos animais WT.

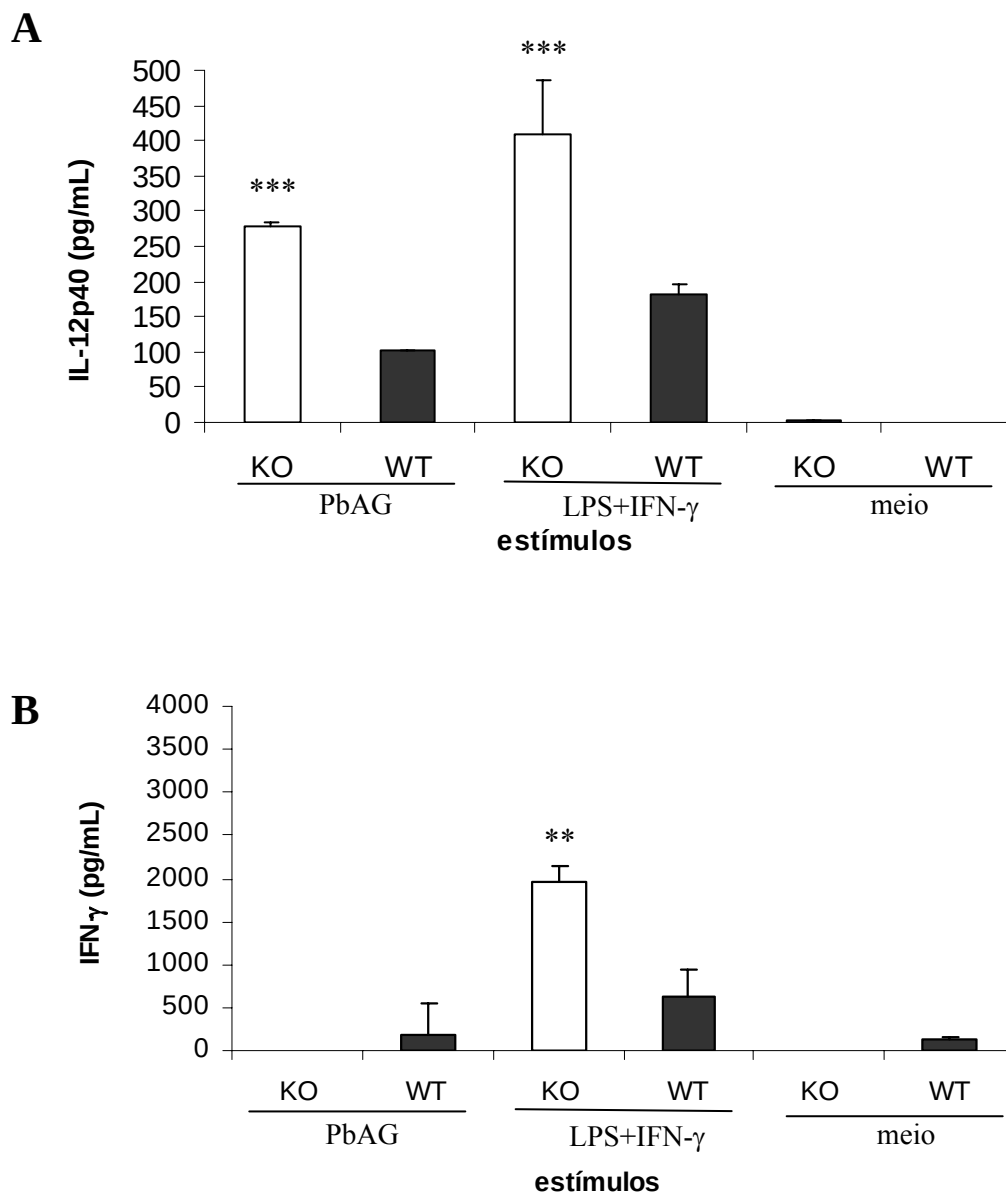


Figura 20: Produção de IL-12 p40 (A) e IFN- γ (B) por células esplênicas de animais gal-3KO e WT, não infectados. Células esplênicas de camundongos gal-3KO e WT, não infectados, foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e incubadas por 48 e 96 horas apenas com meio de cultura ou meio adicionado de diferentes estímulos: antígeno total de *P. brasiliensis* (PbAg - $5 \mu\text{g/mL}$) ou LPS ($5 \mu\text{g/mL}$) e IFN- γ ($1,5 \text{ ng/mL}$). Os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas por ELISA. Cada barra representa a média $\pm$ SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos feitos em duplicata. **: $p < 0,01$: muito significativo em relação aos animais WT; ***: $p < 0,001$: extremamente significativo em relação aos animais WT.

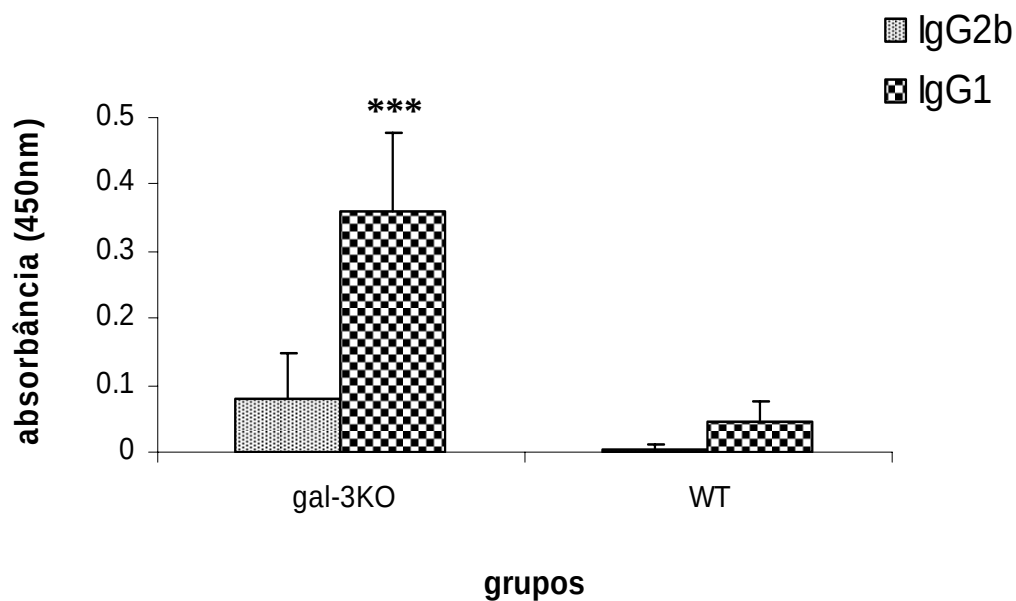


Figura 21: Detecção de IgG1 e IgG2b, específicas para o antígeno total do fungo, no soro de animais gal-3KO e WT após 30 dias de infecção por *P. brasiliensis* Camundongos WT e gal-3KO foram infectados por via intraperitoneal com 5×10^6 leveduras/animal. Trinta dias após infecção o sangue dos animais foi coletado e os soros (diluição 1/90) foram ensaiados por ELISA, utilizando-se microplacas sensibilizadas com antígeno total do fungo ($1 \mu\text{g/mL}$). As barras representam a média $\pm$ SD do soro obtido de 4 animais, isoladamente, feito em duplicata, onde: ***: $p < 0,001$ extremamente significante em relação aos animais WT no mesmo período de infecção.

DISCUSSÃO

A expressão de galectina-3 por células do sistema imunitário, seu papel na modulação da adesão célula-matriz extracelular e seu papel como quimioatraente de macrófagos e monócitos fazem desta lectina candidata a reguladora da resposta inflamatória e imune (Rabinovich *et al*, 2002; Rubinstein *et al*, 2004). Conhecendo a importância de uma resposta imune celular adequada na defesa contra a infecção por *P. brasiliensis*, fomos motivados a investigar o eventual papel exercido por galectina-3 no curso da paracoccidioidomicose experimental. Para tanto, camundongos geneticamente deficientes de galectina-3 (gal-3KO) e camundongos selvagens (WT) foram infectados com o fungo e avaliados quanto ao padrão de resposta imune desenvolvida e o curso da infecção. Dessa maneira demonstramos o papel imunorregulador exercido por galectina-3 na infecção por *P. brasiliensis*, revelado pelo fato de que na ausência de galectina-3 os animais apresentaram menor resposta inflamatória, maior carga fúngica e menor produção de citocina IFN- γ , característica de resposta Th1.

A detecção de granulomas nos pulmões dos animais selvagens (C57Bl/6) infectados com *P. brasiliensis* foi mais intensa após 15 dias de infecção e acentuou-se a partir dos 30 dias. O aumento no número de granulomas associou-se a aumento da expressão de galectina-3, detectada em células inflamatórias, um achado coerente com relatos da literatura de expressão de galectina-3 em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (revisto por Sano & Liu, 2001) além de células T e B ativadas (Joo *et al*, 2001; Acosta-Rodriguez *et al*, 2004). Havia acentuada expressão de galectina-3 em células macrofágicas situadas nos granulomas, especialmente nas que estavam ao redor dos fungos. Uma vez que maior número de granulomas e maior expressão de galectina-3 foram verificadas após 15 dias de infecção no animal selvagem, consideramos ser o

período subsequente a 15 dias de infecção adequado para exame dos parâmetros da doença nos animais nocauteados do gene da galectina-3.

A literatura indica que a geração de animais *knockouts* para o gene da galectina-3, num primeiro momento, pareceu não provocar defeitos fenotípicos aparentes. Hsu e colaboradores (2000) foram os primeiros a demonstrar que a deficiência da lectina resulta em migração menor e retardada de granulócitos para a cavidade peritoneal, frente ao estímulo com tioglicolato. Recentemente, Zuberi *et al* (2004) demonstraram o papel da galectina-3 na inflamação das vias aéreas, utilizando-se de um modelo murino de asma induzido por ovalbumina (OVA). Camundongos deficientes de galectina-3 sensibilizados com OVA e depois desafiados com o mesmo antígeno desenvolvem uma inflamação mais discreta nas vias aéreas do que camundongos selvagens.

Em nosso modelo experimental, que utilizou a via intraperitoneal de infecção, as principais manifestações de uma resposta inflamatória retardada foram detectadas no fígado: animais gal-3KO apresentaram uma resposta inflamatória mais leve em comparação aos WT. O número de granulomas formados no fígado dos animais gal-3KO foi menor em todo o período analisado, com destaque para 30 e 45 dias após a infecção. Além de estarem em menor número, os granulomas dos animais gal-3KO eram menos organizados, fato que sabidamente contribui para maior disseminação fúngica (Miyaji *et al.*, 1983). Realmente, o número de leveduras recuperadas do pulmão de animais gal-3KO, órgão alvo do parasita (revisto por Lacaz, 1994), tanto após infecção intraperitoneal como após desafio endovenoso, foi significativamente maior do que o recuperado no pulmão dos animais selvagens.

O sistema monocítico-histiocítico proporciona um mecanismo efetor na defesa contra o *P. brasiliensis* (Negroni, 1994) e a formação de granulomas compactos colabora para a contenção do fungo, evitando sua disseminação (Miyaji & Nishimura,

1983). Macrófagos ativados exercem importante papel na infecção por *P. brasiliensis*, pois fagocitam e destroem as leveduras (Brummer *et al.*, 1988). As leveduras fagocitadas perdem a integridade das mitocôndrias, formam-se vacúolos e o citoplasma se desintegra, fazendo surgir células vazias de paredes intactas (Brummer *et al.*, 1990), como as vistas em muitos dos cortes histológicos examinados.

O processo de fagocitose por macrófagos envolve a participação de galectina-3, uma vez que macrófagos de animais gal-3KO, em comparação aos de WT, fagocitam um número menor de hemácias de carneiro opsonizadas e de timócitos apoptóticos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Sano *et al.*, 2003). A fagocitose de fungos por células mononucleares é evento importante na infecção por *P. brasiliensis*. Tais células, quando ativadas, adquirem grande capacidade fungicida, sendo responsáveis pela morte das leveduras fagocitadas (Brummer *et al.*, 1990). Como a ausência de galectina-3 implica em capacidade fagocítica prejudicada e em menor migração de macrófagos para o local da infecção fúngica, justifica-se plenamente a recuperação de um número maior de leveduras nos órgãos de animais gal-3KO do que de animais WT.

A análise imunohistoquímica dos fragmentos de fígado dos animais selvagens, revelada por anticorpo monoclonal específico, mostrou que a galectina-3 é expressa por células inflamatórias que formam os granulomas hepáticos. A marcação parece ser mais intensa nas células que margeiam o fungo. É possível notar a expressão da lectina no interior das células inflamatórias, principalmente no citoplasma, local onde galectina-3 é claramente predominante, conforme já descrito por Gaudin e colaboradores (2000).

A despeito de seu bem estabelecido papel na imunidade inata (pró-inflamatório), até bem recentemente havia apenas alguns indícios de um possível papel da galectina-3 na imunidade adaptativa. Alguns exemplos incluem os seguintes trabalhos: (1) Cortegano e cols. (1998) demonstraram que galectina-3 regula negativamente a

expressão de IL-5 em eosinófilos humanos, podendo ser utilizada na regulação de reações alérgicas; (2) Swarte e cols. (1998) demonstraram que galectina-3 promove a interação célula dendrítica/linfócito T naíve e; (3) Joo e cols. (2001) demonstraram que a inibição *in vitro* de galectina-3 bloqueia a proliferação de linfócitos T estimulados via TCR.

O presente trabalho, associado a outros estudos que vêm sendo desenvolvidos por nosso grupo, colabora para o estudo das funções da galectina-3 na regulação da resposta imune, utilizando um modelo de infecção fúngica. Nossos resultados confirmam evidências prévias de que a deficiência de galectina-3 promove uma menor resposta inflamatória, demonstrada pelo menor número de granulomas formados e maior número de leveduras encontradas nos animais nocaute. Além disso, conduzimos a investigação no sentido de verificar se a deficiência de galectina-3 interferia na produção de citocinas por células imunocompetentes, capazes de alterar o eixo Th1/Th2 da resposta imune adaptativa.

Coerentemente com estudos do nosso grupo sobre o papel da galectina-3 na imunidade ao *Toxoplasma gondii* (Bernardes *et al.*, manuscrito submetido), nossos resultados mostram que células esplênicas de camundongos gal-3KO infectados com *P. brasiliensis* secretam níveis maiores de IL-12p40 frente a estímulos específicos (PbAg) ou inespecíficos (LPS/IFN- γ) do que os secretados pelas células de camundongos selvagens, também infectados. Essa produção parece não depender da utilização de estímulos, uma vez que apenas na presença de meio de cultura já ocorre maior produção de IL-12 por células dos animais gal-3KO.

Sendo assim, a ausência de galectina-3 parece colaborar para uma maior produção de IL-12 por células esplênicas. Podemos especular que a produção alterada de IL-12 ocorra da seguinte maneira: algumas lectinas presentes em células do sistema

imune inato são capazes de discriminar glicanas próprias de não-próprias, dotando o organismo de um mecanismo para a identificação de glicanas estranhas expressas por patógenos (chamadas de PAMPs – pathogen-associated molecular patterns), o que se constitui, na maioria das vezes, um mecanismo de eliminação dos mesmos. A lectina MBP (mannose-binding protein) presente no soro, pode distinguir glicanas próprias de não próprias devido a diferenças na glicosilação entre as células de mamíferos e a da maioria dos microorganismos, o que leva a formação de glicoproteínas e glicolipídeos espécie-específicos. A freqüente presença de resíduos de manose terminal em glicanas de microorganismos os torna alvos fáceis para o reconhecimento por essa lectina no soro, levando à ativação do sistema complemento (Turner, 1996; Weis *et al.*, 1998). O receptor de manose de macrófagos (MR) é outra lectina que também atua ligando-se a glicanas contendo resíduos de manose terminal, como as freqüentemente encontradas na superfície de microorganismos, exercendo importante papel na fagocitose dos mesmos. Isso posto, podemos levantar a hipótese de que galectina-3 esteja agindo como um receptor para as glicanas presentes na superfície do *P. brasiliensis*, de forma a evitar a ligação das glicanas fúngicas aos receptores Toll like presentes nos fagócitos. A ligação ao receptor Toll like promove sinalização para o núcleo da célula, que culminará com a ativação de genes envolvidos com a produção de citocinas, como IL-12 (Janeway, 2001). Na ausência de galectina-3 (camundongo gal-3KO), não há ligação dessa lectina às glicanas presentes na superfície do fungo, que passariam a estar disponíveis para o reconhecimento por receptores presentes na superfície dos fagócitos (receptores Toll like), promovendo uma amplificação da sinalização e consequente produção de citocinas, como IL-12. A ligação por galectina-3 dessas glicanas estaria diminuindo sua disponibilidade para ligação aos receptores da superfície dos fagócitos, diminuindo assim a resposta dessa célula com relação à produção de IL-12. Dessa maneira, o

camundongo selvagem (WT) passa a produzir menos IL-12, já que os fagócitos estariam sendo menos ativados pelas glicanas fúngicas.

IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, formada por duas cadeias: p35 (com peso molecular de 35kDa) e p40 (com 40kDa). A cadeia p35 é constitutivamente expressa em tecidos somáticos, enquanto a cadeia p40 é induzível, produzida por macrófagos e células dendríticas, de maneira altamente regulada (Decken *et al.*, 1998). Essa citocina atua de modo a promover inflamação, induz a produção de IFN- γ , favorece a diferenciação de células Th0 para um perfil de resposta Th1, constituindo um elo importante entre imunidade inata e adaptativa (revisto por Trinchieri, 2003). IL-12 é produzida por células T, macrófagos e células dendríticas, estas ativadas na presença de microorganismos e/ou seus produtos de secreção, como LPS. Uma vez secretada, IL-12 atua na ativação de células T, NK e de maneira autócrina, em macrófagos e células dendríticas (revisto por Bastos *et al.*, 2004). Intrigantemente, a despeito da alta produção de IL-12, os níveis de IFN- γ produzidos por células esplênicas estimuladas de camundongos gal-3KO foram similares aos produzidos por células de WT infectados.

Na infecção por *P. brasiliensis*, IL-12 é considerada um fator de resistência, uma vez que animais IL-12KO morrem antes de completar um mês de infecção e apresentam prejuízo na formação de granulomas (Livonesi, 2001). Animais deficientes de IL-12 e infectados com *Cryptococcus neoformans* apresentam mortalidade elevada, granulomas mal formados e elevada carga fúngica, mostrando a importância dessa citocina em infecções causadas por fungos (Decken *et al.*, 1998).

Apesar da maior produção de IL-12, camundongos gal-3KO infectados apresentam granulomas mal formados e menor produção de IFN- γ por células esplênicas não estimuladas, fatos que parecem contraditórios. Galectina-3, sabidamente, promove migração de macrófagos/monócitos e nossos resultados mostram que sua

ausência associa-se a resposta inflamatória atenuada e geração de granulomas mal formados, ainda que determine níveis altos de produção *in vitro* de IL-12. Camundongos WT infectados, mesmo produzindo menores níveis de IL-12 *in vitro*, montam uma resposta inflamatória adequada, capaz de conter a disseminação fúngica, fato que destaca o importante papel de galectina-3 na regulação da resposta inflamatória.

Células esplênicas provenientes de camundongos não infectados também produzem níveis mais altos de IL-12 quando coletadas de animais gal-3KO do que de WT, tanto em resposta a antígeno fúngico (PbAg) como em resposta a LPS e IFN- γ , indicando uma produção intrínseca dessas células, que se acentua após a infecção pelo fungo. Esses resultados novamente sugerem que galectina-3 agiria como um receptor para glicanas do fungo e que estas seriam capazes de estimular a produção de IL-12 por células de animais não infectados. Apenas o estímulo inespecífico (LPS/IFN- γ) foi capaz de estimular a produção de IFN- γ por células de animais não infectados, produção esta que também foi maior no animal gal-3KO. Esses dados referentes aos animais não infectados são coerentes com os obtidos por Bernardes e colaboradores no modelo de infecção por *T. gondii* (manuscrito submetido).

A deficiência de galectina-3 durante a infecção por *P. brasiliensis* parece alterar a resposta de células T e/ou NK frente à produção aumentada de IL-12. Concentrações similares de IFN- γ foram produzidas por células esplênicas de camundongos gal-3KO e WT, a despeito do fato de haver produção 6 vezes maior de IL-12 por células de animais gal-3KO do que de WT. Isso sugere que galectina-3 regule a produção de IFN- γ por células T e NK, após a infecção. O fungo parece participar da determinação dessa alteração na produção de IFN- γ nos animais deficientes uma vez que, dentre células esplênicas de animais não infectados, as de gal-3KO produzem maiores níveis dessa

citocina enquanto que dentre as células de animais infectados, as de animais WT são as maiores produtoras.

A subunidade p40 do heterodímero de IL-12 é descrita como exercendo ação antagônica à determinada pela molécula íntegra, por competir com a IL-12 íntegra pela ligação à subunidade $\beta 1$ do receptor de IL-12 (IL-12R) presente em células T e NK (Gately *et al.*, 1996; Presky *et al.*, 1998) e, dessa maneira, inibir as respostas dependentes de IL-12, como a produção de IFN- γ (Mattner *et al.*, 1993; Gillessen *et al.*, 1995; Heinzel *et al.*, 1997). Detectamos, no sobrenadante de células esplênicas de camundongos gal-3KO, altas concentrações de IL-12p40, fato que pode explicar a menor detecção de IFN- γ , principalmente no sobrenadante das células que não foram estimuladas. Essa hipótese é reforçada por não haver níveis detectáveis de IL-12p70 no sobrenadante de camundongos gal-3KO ou WT infectados (não mostrado). Assim, macrófagos e/ou células dendríticas de animais gal-3KO produziram altas concentrações de IL-12p40, não associada à IL-12p70, o que inibiria as respostas de células T e NK de produção de IFN- γ .

IFN- γ é uma citocina-chave na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, por ativar macrófagos e induzir a síntese de intermediários reativos do nitrogênio (revisto por Trinchieri, 2003). Na infecção por *P. brasiliensis* o papel crucial exercido por IFN- γ está estabelecido; essa citocina ativa macrófagos capacitando-os a destruir leveduras fagocitadas (Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Na paracoccidiodomicose murina experimental, respostas de tipo Th1, com produção de IFN- γ e IL-2, associam-se a maior ativação de macrófagos, evitando a progressão e disseminação da doença (Cano *et al.*, 1995). Animais GKO (*knockout* para o receptor de IFN- γ) infectados com *P. brasiliensis* morrem após 16 dias de infecção, apresentando elevada carga fúngica no fígado, baço e pulmões (Souto *et al.*, 2000). Nossos resultados *in vitro* mostraram que a

deficiência de galectina-3 durante a infecção por *P. brasiliensis* leva a uma menor produção de IFN- γ por células esplênicas, mesmo na ausência de estímulos.

Como já citado, IL-12 não apenas induz a produção de IFN- γ , como também favorece o desenvolvimento de células Th1, antagonizando os efeitos de IL-4, citocina característica do padrão Th2 de resposta. Não detectamos IL-4 no sobrenadante da cultura de células esplênicas de camundongos gal-3KO e WT (dado não mostrado), enquanto IL-10, citocina que inibe a produção de IL-12 por macrófagos ativados, foi detectada em concentrações pequenas e similares nos mesmos sobrenadantes (não mostrado). Descarta-se, assim, a possibilidade de que IL-10 seja a responsável pela menor produção de IL-12 por células do animal WT ou pela menor produção de IFN- γ pelas células dos animais gal-3KO não estimuladas. IL-10 é produzida relativamente tarde durante a resposta imune; ela exerce potente atividade anti-inflamatória e resolve a reação inflamatória numa fase em que o estímulo antigênico está neutralizado (Malefyt, 1999). Assim, o fato de termos detectado baixas concentrações de IL-10 nos sobrenadantes pode ser atribuível à utilização de células esplênicas de animais em um período inicial da infecção (7 dias).

Podemos especular, ainda, que a menor produção de IFN- γ pelos animais gal-3KO, principalmente a ocorrida na ausência de estímulos, seja atribuível à morte mais precoce das células desses animais do que das células dos animais WT. Assim, após 96 horas de cultivo (tempo utilizado para a dosagem de IFN- γ), um número menor de células do animal gal-3KO era viável, fato que poderia acarretar menor detecção de citocinas no sobrenadante.

Buscando dados adicionais que reforçassem a idéia de que animais gal-3KO apresentem menor resposta Th1 do que animais WT, realizou-se isotipagem de anticorpos específicos para o fungo em amostras de soro de ambas as linhagens de

camundongos, aos 30 dias de infecção. Os resultados demonstram que camundongos gal-3KO apresentaram níveis significativamente maiores de IgG1 (que caracteriza um padrão Th2) do que os detectados no soro de animais WT. Entretanto, não detectamos maiores níveis de IL-4 no soro dos animais gal-3KO infectados (dado não mostrado), achado que confirmaria um deslocamento de resposta nos animais gal-3KO para um padrão Th2. Como os camundongos utilizados são de *background* genético C57Bl/6, que apresentam um padrão misto de resposta e susceptibilidade intermediária à infecção por *P. brasiliensis*, é válido supor que a ausência de citocinas Th1, não associada a maior produção de citocinas Th2, tenha levado ao deslocamento de resposta para uma maior produção de IgG1. Já em camundongos WT, a produção de IgG1 e IgG2b foi semelhante, mostrando que o animal selvagem realmente exibe um padrão misto de resposta, diferindo portanto do camundongo gal-3KO, que inclinou-se para o eixo Th2 de resposta à infecção por *P. brasiliensis*.

No modelo de infecção por *T. gondii*, o balanço das citocinas Th1/Th2 também foi alterado nos animais gal-3KO em comparação aos WT (Bernardes *et al.*, submetido). Nesse modelo, os animais deficientes produziram níveis maiores de IgG2a do que os selvagens, associados à maior resposta de padrão Th1, que é protetora frente a infecção pelo parasita. Zuberi e colaboradores (2004) observaram também uma alteração do eixo Th1/Th2 nos animais gal-3KO, com predomínio de um padrão Th1 nos animais deficientes, que foi acompanhado de uma menor resposta inflamatória nos pulmões. O trabalho realizado pelo grupo envolve um modelo murino de asma induzido por OVA, no qual o estabelecimento de uma resposta Th2 é prejudicial, pois leva ao aumento da produção de IgE e ao agravamento do quadro de hiperresponsividade das vias aéreas.

Diante das observações de Zuberi *et al.* (2004), Bernardes *et al.* (submetido) e dos resultados apresentados no presente trabalho, podemos concluir que a deficiência de

galectina-3 interfira na resposta imunitária, alterando tanto a resposta inata (inflamatória) como a resposta adaptativa (produção de citocinas e anticorpos). Essa, entretanto, é dependente do modelo de infecção e/ou inflamação utilizado, evidenciando a necessidade de maiores investimentos em estudos com animais deficientes para o gene da galectina-3, a fim de se entender melhor os mecanismos que governam os diferentes padrões de resposta. Nossos resultados mostraram que a deficiência de galectina-3 no modelo de infecção por *P. brasiliensis* associa-se à menor resposta inflamatória, à maior produção de IL-12 *in vitro* e, surpreendentemente, à menor produção de IFN- γ . Sugere-se, assim, que a deficiência de galectina-3 na infecção por *P. brasiliensis* altere a resposta de células do sistema imunitário, como células T e NK. A menor produção de IFN- γ parece inclinar o padrão de resposta dos animais gal-3KO infectados, de um padrão misto para um padrão Th2.

Nossos resultados mostram que células esplênicas totais de animais gal-3KO em condições de não infecção secretam níveis maiores de IL-12 do que as de animais WT. Células dendríticas, e não macrófagos, parecem ser as responsáveis por essa produção (Emerson S. Bernardes - comunicação pessoal). Recentemente, Ferreira e colaboradores (2004) mostraram que células dendríticas estão reguladas negativamente após interação com *P. brasiliensis* e, como consequência, produzem menos IL-12 e TNF- α em comparação a células dendríticas que não tiveram contato com o fungo. Podemos supor que as células dendríticas dos animais gal-3KO infectados não estão sendo reguladas negativamente após a interação com o fungo, uma vez que estas já produziam níveis elevados de IL-12 em condições normais (não infecção) e, após a infecção, não foram detectadas alterações drásticas na produção dessa citocina por células esplênicas totais. O modelo de infecção, portanto, parece ser crucial na determinação do padrão de

resposta montado pelos animais deficientes em galectina-3, quando comparados aos animais selvagens.

CONCLUSÕES

Galectina-3 exerce importante papel durante a infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que:

1. Animais deficientes de galectina-3 apresentam resposta inflamatória atenuada, caracterizada por um número significativamente menor de granulomas presentes no tecido hepático após 30 e 45 dias de infecção, em comparação com o animal selvagem;
2. Animais deficientes apresentaram maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de órgão no pulmão e fígado em comparação aos animais WT;
3. A ausência de galectina-3 inclina o eixo misto de resposta Th1/Th2 montado pelo animal C57Bl/6 frente à infecção por *P. brasiliensis* para um padrão Th2, manifesto por maiores níveis séricos de IgG1, maior carga fúngica presente nos órgãos analisados e menores níveis de IFN- γ detectados nos sobrenadantes da cultura de células esplênicas de animais infectados, na ausência de estímulos.

RESUMO

Galectina-3 é proteína membro de uma família de lectinas animais ligante de β -galactosídeos, cuja atividade pró-inflamatória é conhecida. A expressão de galectina-3 por células do sistema imunitário, seu papel modulador da adesão célula-matriz extracelular, bem como de atrair macrófagos e monócitos fazem desta lectina candidata a reguladora da resposta inflamatória e imune. Os poucos estudos sobre galectina-3 e resposta imunitária e/ou inflamatória foram realizados *in vitro*. O papel dessa lectina *in vivo*, em processos patológicos e fisiológicos, é pouco estudado.

Durante a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, a imunidade celular corresponde ao principal mecanismo de defesa do hospedeiro. Células fagocíticas ativadas são fungicidas e leveduras que escapam da destruição suscitam resposta inflamatória granulomatosa. A formação de granulomas compactos colabora para a contenção do fungo e evita sua disseminação. O desencadeamento de uma resposta imune celular adequada, caracterizada pela produção de citocinas de padrão Th1 e formação de granulomas compactos é protetora na infecção por *P. brasiliensis*. Tal quadro nos motivou a investigar um possível papel para a galectina-3 no curso da paracoccidioidomicose experimental.

Inicialmente investigamos se a formação de granulomas nos pulmões de animais C57Bl/6 relacionava-se com a maior expressão de galectina-3 pelas células inflamatórias. Estudo cinético mostrou haver associação direta entre o número de granulomas formados e detecção de galectina-3 no tecido. A partir do 15º dia de infecção o pulmão dos animais apresentava acentuado número de granulomas e maior detecção de galectina-3. Assim, períodos subsequentes a 15 dias de infecção foram

utilizados para a análise de alguns aspectos da doença em animais nocauteados do gene da glectina-3 (gal-3KO).

Camundongos gal-3KO infectados, em todo o período analisado, apresentaram menor resposta inflamatória no fígado, caracterizada pela formação de granulomas de menor tamanho e em menor número, em comparação aos formados no fígado do animal WT. A menor resposta inflamatória observada nos animais gal-3KO acompanhou-se de maior recuperação hepática de leveduras.

Avaliamos se a produção de citocinas também sofria interferência da ausência de glectina-3. Células esplênicas de camundongos gal-3KO infectados com *P. brasiliensis* secretaram níveis maiores de IL-12p40 do que células de camundongos selvagens, também infectados. Intrigantemente, a despeito da alta produção de IL-12, os níveis de IFN- γ produzidos por células esplênicas de animais gal-3KO foram similares aos produzidos por células de WT infectados. Isso sugere que glectina-3, direta ou indiretamente, regule a produção de IFN- γ por células T e NK, após a infecção.

A isotipagem de anticorpos séricos específicos para o fungo, em ambas as linhagens de camundongos, aos 30 dias de infecção, revelou que os animais gal-3KO apresentaram níveis significativamente maiores de IgG1 - que caracteriza um padrão Th2 de resposta imune - do que os detectados no soro de animais WT. Já em camundongos WT foram detectados níveis similares de IgG1 e IgG2b, denotando um padrão misto de resposta. Assim, a ausência de glectina-3 parece ter inclinado um padrão misto para um padrão Th2 de resposta à infecção por *P. brasiliensis*.

Respaldados por recentes relatos de que a ausência de glectina-3 altera o padrão de resposta imune na asma e na toxoplasmose, concluímos que a deficiência de glectina-3 altera a resposta imunitária na paracoccidiodomicose, interferindo tanto na resposta inata (inflamatória) como a resposta adaptativa (produção de citocinas e

anticorpos). Postulamos que a interferência exercida por galectina-3 varie em função do modelo de infecção e/ou inflamação utilizado e que maiores investimentos em estudos com animais deficientes para o gene da galectina-3 sejam necessários para melhor compreensão dos mecanismos que governam os padrões de resposta.

ABSTRACT

Galectin-3 is a member of a family of β -galactoside binding animal lectins, known for its pro-inflammatory activity. Because galectin-3 is expressed by a variety of immune cells, modulates cell-matrix adhesion, and is a monocyte/macrophage chemoattractant, it is candidate to act as a regulator of immune and inflammatory response. The majority of studies concerning galectin-3 and immune or inflammatory response were performed *in vitro*. Few studies focus on roles exerted *in vivo* by this lectin, during physiological or pathological processes.

Cellular immune response is the main mechanism of host defense against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Activated phagocytic cells are fungicides and yeast cells that escape the destruction mechanisms of the phagocytes provoke a granulomatous inflammatory response. Formation of compact granulomas enables yeasts contention and avoids their dissemination. Triggering of adequate cellular immune response, characterized by Th1 type cytokines production and compact granuloma formation, is protective against *P. brasiliensis* infection. This scenario has motivated us to investigate a possible role for galectin-3 exerted during experimental paracoccidioidomycosis.

First we investigated if granuloma formation in the lungs of infected C57Bl/6 mice was related to galectin-3 expression by inflammatory cells. A kinetic study showed a direct association of number of granulomas and galectin-3 tissue labeling. On day 15th of infection, the animal lungs presented large number of granulomas and high galectin-3 detection. Periods following 15 days of infection were then used to analyze several aspects of the disease in galectin-3 knockout mice (gal-3KO).

Compared to wild type (WT) mice, gal-3KO mice presented a milder inflammatory response in the liver, which was accompanied by a higher fungal load.

We have evaluated if the absence of galectin-3 also interfered with cytokine production by spleen cells. The gal-3KO infected mice produced higher amounts of IL-12p40 than WT infected mice. Surprisingly, despite a high IL-12 production, levels of IFN- γ produced by splenic cells from gal-3KO mice were similar to levels produced by cell from WT mice. This suggests that galectin-3 regulates, directly or indirectly, the IFN- γ production by T and NK cells after infection.

Isotypic analysis of seric specific antibodies of both WT and gal-3KO mice at 30 days after infection revealed that gal-3KO mice presented significantly higher levels of IgG1 - that characterizes a Th2 pattern of immune response. Similar levels of IgG1 and IgG2b antibodies were detected in serum from WT mice, denoting a mixed pattern of immune response to *P. brasiliensis* infection. Therefore, the absence of galectin-3 may have changed the mixed pattern of immune response observed in the WT mice to a Th2 pattern, observed in gal-3KO mice, after *P. brasiliensis* infection.

Supported by recent observations that the absence of galectin-3 modifies the immune response during asthma and toxoplasmosis, we have concluded that galectin-3 deficiency also modifies the immune response in paracoccidioidomycosis, interfering in both innate (inflammation) and adaptive (cytokines and antibody production) compartments. We postulate that the interference exerted by galectin-3 varies according the infection model used, and that extensive studies with gal-3KO mice are necessary to better understanding the mechanisms governing immune response patterns.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V.; MONTES, C.L.; MOTRÁN, C.C.; ZUNIGA, E.I.; LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. & GRUPPI, A. Galectin-3 mediates IL-4 induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, **172**: 493-502, 2004.
- AGRWAL, N.; WANG, J.L. & VOSS, P.G. Carbohydrate-binding protein 35: levels of transcription and mRNA accumulation in quiescent and proliferating cells. **J. Biol. Chem.**, **264**: 17236-17242, 1989.
- AKAHANI, S.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H.; KIM, H.R. & RAZ, A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Res.**, **57** (23): 5272-5276, 1997.
- ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. São Paulo**, **5**: 125-141, 1930.
- ALMKVIST, J. & KARLSSON, A. Galectins as inflammatory mediators. **Glycoconj J.**, **19**: 575-581, 2004.
- ANJOS, A.R.; CALVI, S.A.; FERRACINI, R.; PERAÇOLI, M.T.S.; SILVA, C.L. & SOARES, A.M.V.C. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall containing β -glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. **Med. Mycol.**, **40**: 377-382, 2002.
- ARANGO, M. & YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, **79** (2): 115-123, 1982.

- ARISTIZABAL, B.H., CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. & RESTREPO, A.
Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect. Immun.**, **66** (11): 5587-5591, 1998.
- ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; PINA, A.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; VAZ, C.A.C.; FRANCO, M.F.; KELLER, A.C. & CALICH, V.L.G. Dual role of Interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on host genetic pattern. **Infect. Immun.**, **72** (7): 3932-3940, 2004.
- ASHWELL, G. & MORELL, A.G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. **Adv Enzymol.**, **41**: 99-128, 1974.
- AZUMA, I.; KANETSUNA, F.; TANAKA, Y.; YAMAMURA, Y. & CARBONELL, L.M. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, **54**: 111-125, 1974.
- BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.W.; GITT, M.A. & LEFFLER, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.**, **269** (33): 20807-20810, 1994.
- BASTOS, K.R.B.; MARINHO, C.R.F.; BARBOZA, R.; RUSSO, M.; ÁLVAREZ, J.M. & LIMA, M.R.D. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? **Microbes Infect.**, **6**: 630-636, 2004.
- BEDOYA, V.; McEWEN, J.; TABARES, A.M.; URIBE, F. & RESTREPO, A. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a histopathological study of the experimental murine infection. **Mycopathologia**, **94**: 133-144, 1986.

- BEUTLER, B.; TKACENKO, V.; MILSARK, I.; KROCHIN, N. & CERAMI, A. Effect of gamma interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. Reversal of the lpsd (endotoxin resistance) phenotype. **J. Exp. Med.**, **164**: 1791-1796, 1986.
- BERNARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T. & DUARTE A.J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral responses. **J. Infect. Dis**, **175**: 1263-1267, 1997.
- BEVILACQUA, M.; BUTCHER, E.; FURIE, B.; GALLATIN, M.; GIMBRONE, M.; HARLAN, J.; KASHIMOTO, K.; LASKY, L. & McEVER, R. Selectins: a family of adhesion receptors. **Cell**, **67**: 233, 1991.
- BOCCA, A.L.; HAYASHI, E.E.; PINHEIRO, A.G.; FURLANETTO, A.B.; CAMPANELLI, A.P.; CUNHA, F.Q. & FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, **161** (6): 3056-3063, 1998.
- BOCCA, A.L.; SILVA, M.F.; SILVA, C.L.; CUNHA, F.Q. & FIGUEIREDO, F. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice. **Am. J. Med. Hyg.**, **61** (2): 280-287, 1999.
- BOYD, W.C. & REGUERA, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **J. Immunol.**, **62**: 333-339, 1949.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins) **Science**, **119**: 419, 1954.

- BRANDLEY, B.K. & SCHNAAR, R.L. Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response. **J. Leukoc. Biol.**, **40** (1): 97-111, 1986.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. & RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6** (2): 89-117, 1993.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by INF- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitides*. **J. Immunol**, **40**: 2786-2789, 1988.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A. & STEVENS, D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect. Immun.**, **57** (8): 2289-2294, 1989.
- BRUMMER, E.; SUN, S.H. HARRISON, J.L.; PERLMAN, A.M.; PHILPOTT, D.E. & STEVENS, D.A. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. **Infect. Immun.**, **58** (8): 2628-2636, 1990.
- CALICH, V.L. & KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31** (5): 615-623, 1998.
- CALICH, V.L., PURCHIO A. & PAULA C.R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathol.**, **66** (3):175-177, 1979.
- CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.C.; RUSSO, M. & CALICH, V.L.G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular

- immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, **63** (5): 1777-1783, 1995.
- CASTAÑEDA, E. **Immunological studies in murine paracoccidioidomycosis**, 1985.
PhD Thesis - University of California, San Francisco, 1985.
- CHEQUER-BOU-HABIB, D.; FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; OLIVEIRA-NETO, M.P. & GALVÃO-CASTRO, B. The possible role of circulating immune complexes in paracoccidioidomycosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **22**: 205-212, 1989.
- COLLINS, T. Inflamação Aguda e Crônica. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V. & COLLINS, T. (Eds). **Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, 2000. pp 44-78.
- COLNOT, C.; RIPOCHE, M.A.; MILON, G.; MONTAGUTELLI, X.; CROCKER, P.R. & PORRIER, F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3 null mutant mice. **Immunol.**, **94**: 290-296, 1998.
- COOK, G.M. Cell surface carbohydrates: molecules in search of a function? **J. Cell. Sci.** (Suppl., 4): 45-70, 1986.
- CORTEGANO, I.; del POZO, V.; CÁRDABA, B.; de ANDRÉS, B.; GALLARDO, S.; del AMO, A.; ARRIETA, I.; JURADO, A.; PALOMINO, P.; LIU, F.T. & LAHOZ, C. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. **J. Immunol.**, **161**: 385-389, 1998.
- COSTA, J.C.; PAGNANO, P.M.G.; BECHELLI, L.M.; FIORILLO, A.M. & LIMA-FILHO, E.C. Lymphocyte transformation test in patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, **84**: 53-63, 1983.

- DAGHER, S.F, WANG, J.L. & PATTERSON, R.J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92** (4): 1213-1217, 1995.
- DECKEN, K.; KOHLER, G.; PALMER-LEHMANN, K.; WUNDERLIN, A.; MATTNER, F.; MAGRAM, J.; GATELY, M.K. & ALBER, G. Interleukin-12 is essential for a protective response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, **66** (10): 4994-5000, 1998.
- DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.**, **263**: 9557-9560, 1988.
- FERREIRA, K.S.; LOPES, J.D. & ALMEIDA, S.R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol. Lett.**, **94**: 107-114, 2004.
- FIGUEIREDO, F.; ALVES, L.M.C. & SILVA, C.L. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clin. Exp. Immunol.**, **93**: 189-194, 1993.
- FIGUEIREDO, F.; SILVA, C.L.; ALVES, L.M.C. & ROSSI, M.A. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **19**: 651-653, 1986.
- FLOTTE, T.J., SPRINGER, T.A. & THORBECKE, G.J. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. **Am. J. Pathol.**, **111** (1): 112-124, 1983.
- FRANCO, M. & MONTENEGRO, M.R. Anatomia Patológica. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S. & FIORILLO, A.M. (Eds). **Paracoccidioidomicose - Blastomicose sul-americana**. SARVIER: Ed. Univ. São Paulo, São Paulo-SP, 1982. pp 97-117.

- FUKOMORI, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHII, T.; KIM, H.R.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; KAGAWA, S.; RAZ, A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Res.**, **63**: 8302-8311, 2003.
- GATELY M.K.; CARVAJAL D.M.; CONNAUGHTON S.E.; GILLESSEN S.; WARRIER R.R.; KOLINSKY K.D.; WILKINSON V.L.; DWYER C.M.; HIGGINS G.F. Jr; PODLASKI F.J.; FAHERTY D.A.; FAMILLETTI P.C.; STERN A.S. & PRESKY D.H. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer *in vitro* and *in vivo*. **Ann. NY Acad. Sci.**, **795**: 1-12, 1996.
- GAUDIN, J.C.; MEHUL, B. & HUGHES, R.C. Nuclear localization of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells. **Biol. Cell**, **92**: 49-58, 2000.
- GENNARI-CARDOSO, M.L. **Paracoccina: lectina de *Paracoccidioides brasiliensis*, ligante de N-acetilglicosamina, interage com componente de matriz extracelular**. 2000. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2000.
- GILLESSEN S.; CARVAJAL D.; LING P.; PODLASKI F.J.; STREMLIO D.L.; FAMILLETTI P.C.; GUBLER U.; PRESKY D.H.; STERN A.S. & GATELY M.K. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. **Eur. J. Immunol.**, **25** (1): 200-206, 1995.
- GONZALES, A.; de GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A. & CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, **68**: 2546-2552, 2000.
- GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.YT.; MELTZER, M.S. & NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent

- killing mechanisms in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of TNF - α . **J. Immunol.**, **145**: 4290, 1990.
- GREEN, S.J. & NACY, C.A. Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, **6**: 384, 1993.
- HARRISON, F.L. & CHESTERTON, C.J. Factors mediating cell-cell recognition and adhesion. Galaptins, a recently discovered class of bridging molecules. **FEBS Lett.**, **122** (2): 157-165, 1980.
- HEINZEL F.P.; HUJER A.M.; AHMED F.N. & RERKO R.M. *In vivo* production and function of IL-12 p40 homodimers. **J. Immunol.**, **158** (9): 4381-4388, 1997.
- HOGAN, L.H. & KLEIN, B.S. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. **Infect. Immun.**, **62** (8): 3543-3546, 1994.
- HO, M.K. & SPRINGER, T.A. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. **J. Immunol.**, **128** (3): 1221-1228, 1982.
- HSU, D.K., YANG, R.Y., PAN, Z., YU, L., SALOMON, D.R., FUNG-LEUNG, W.P. & LIU, F.T. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **Am. J. Pathol.**, **156** (3): 1073-1083, 2000.
- HUGHES, R.C. Galectins as modulators of cell adhesion. **Biochimie**, **83**: 667-676, 2001.
- IABUKI, K. & MONTENEGRO, M.R. Experimental paracoccidioidomycosis in the syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with the presence of specific antigens and serum levels of antibodies. **Mycopathol.**, **67**: 131-144, 1979.

- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. 5th Ed., New York and London, Garland Publishing, 2001. 732p.
- JOO, H.G.; GOEDEGEBUURE, P.S.; SADANAGA, N.; NAGOSHI, M.; BERNSTORFF, W. & EBERLEIN, T.J. Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, **69**: 555-564, 2001.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; MORENO, R.E. & RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, **97** (3): 1035-1041, 1969.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; AZUMA, I. & YAMAMURA, Y. Biochemical studies on thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, **110**: 208-218, 1972.
- KASAI, K. & HIRABAYASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. **J. Biochem.**, **119**: 1-8, 1996.
- KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.G.; BURGER, E. & SINGER-VERMES, L.M. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathol.**, **92**: 173-178, 1985.
- KURITA, N.; OARADA, M.; ITO, E. & MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, **37**: 261-267, 1999.
- KUROKAWA, C.S.; SUGISAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T.S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **40** (3): 125-135, 1998.
- KUWABARA, I. & LIU, F.T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **J. Immunol.**, **156**: 3939-3944, 1996.

- LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiological agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. & DEL-NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994. pp. 1-12
- LEFFLER, H. & BARONDES, S.H. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. **J. Biol. Chem.**, **261** (22): 10119-10126, 1986.
- LIEW, F.Y. The role of nitric oxide in parasitic diseases. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **87**: 637, 1993.
- LIU, F.T., HSU, D.K., ZUBERI, R.I., KUWABARA, I., CHI, E.Y. & HENDERSON, W.R.J. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin in human monocytes and macrophages, **Am. J. Pathol.**, **147**: 1016-1028, 1995.
- LIU, F.T. Galectins: a new family of regulators of inflammation. **Clin. Immunol.**, **97** (2): 79-88, 2000.
- LIVONESI, M.C. **Papel de IL-12 e IL-4 na modulação da resposta imune induzida por *Paracoccidioides brasiliensis***. 2001. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2001.
- MALEFYT, R.W. Role of Interleukin-10, Interleukin-4, and Interleukin-13 in Resolving Inflammatory Responses. In: GALLIN, J.I. & SNYDERMAN, R. (Eds.). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999. pp. 837-849.
- MAMONI, R.L.; NOUER, S.A.; OLIVEIRA, S.J.; MISATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P. & BLOTTA, M.H. Enhance production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, **40**(2): 153-159, 2002.

- MATTNER, F.; FISCHER, S.; GUCKES, S.; JIN, S.; KAULEN, H.; SCHIMITT, E.; RUDE, E. & GERMANN, T. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. **J. Immunol.**, **23** (9): 2202-2208, 1993.
- McEWEN, J.G.; BRUMMER, E.; STENVENS, D.A. & RESTREPO, A. Effect of messine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **36** (3): 603-608, 1987.
- MELO, F.H.M. **Galectina-3 atua como modulador da progressão tumoral de sarcomas experimentais: Evidências de seu envolvimento na tumorigênese e migração celular.** 2002. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo.
Escola Paulista de Medicina, 2002.
- MIYAJI, M. & NISHIMURA, K. Granuloma formation and killing functions of granuloma in congenitally athymic mice infected with *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathol.**, **82**: 129-141, 1983.
- MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E. & STEVENS, D.A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.**, **40** (3):159-164, 1994.
- MOSCARDI-BACCHI, M. & FRANCO, M. Experimental paracocidioidomycosis in the mouse. III. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 101, 1985.
- MOTA, N.G.; REZKALLAH-IWASSO, M.T.; PERAÇOLI, M.T.; AUDI, R.C.; MENDES, R.P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L. &

- FRANCO, M.F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **79** (6):765-772, 1985.
- MUNK, M.E.; KAJDACSY-BALLA, A.; DEL NEGRO, G.; CUCE, L.C. & DA SILVA, W.D. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** **30** (4): 317-321, 1992.
- NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.G.L.; BARRETT, T.V.; NAIFF, M.F.; ARIAS, J.R. Paracoccidioidomicose enzootica em tatus (*Dasypus novencinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **28**: 19-27, 1986.
- NAKAMURA, M., INUFUSA, H., ADACHI, T., AGA, M., KURIMOTO, M., NAKATANI, Y., WAKANO, T., NAKAJIMA, A., HIDA, J.I, MIYAKE, M., SHINDO, K. & YASUTOMI, M. Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis. **Int. J. Oncol.**, **15** (1): 143-148, 1999.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Investig.**, **79**: 319-326, 1987.
- NEGRONI, R. Pathogenesis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. & DEL-NEGRO, G. (Eds.). **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994. pp. 203-212.
- OCHIENG, J.; FURTAK, V. & LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconjugate J.**, **19**: 527-535, 2004.
- PERAÇOLI, M.T.S.; MOTA, N.G.S. & MONTENEGRO; M.R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamsters: morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. **Mycopathologia**, **79**: 7-17, 1982.
- PERILLO, N.L.; MARCUS, M.E. & BAUM, L.G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J. Mol. Med.**, **76**: 402-412, 1998.

- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, **109**: 347-352, 1995.
- PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.W.; VAZ, C.A.C.; KELLER, A. & CALICH, V.L.G. Absence of Interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, **72** (4): 2369-2378, 2004.
- PRESKY D.H.; MINETTI L.J.; GILLESSEN S.; WILKINSON V.L.; WU C.Y.; GUBLER U.; CHIZZONITE R. & GATELY M.K. Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. **J. Immunol.**, **160** (5): 2174-2179, 1998.
- RABINOVICH, G.A.; BAUM, L.G.; TINARI, N.; PAGANELLI, R.; NATOLI, C.; LIU, F.T. & IACOBELLI, S. Galectins and their ligands: amplifiers, silences or tuners of the inflammatory response? **TRENDS in Immunol.**, **23** (6): 313-320, 2002.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D. & STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, **46** (2): 346-353, 1984.
- RESTREPO, A.; RESTREPO, M.; RESTREPO, F.; ARISTIZABAL, L.H.; MONCADA, L.H. & VELEZ, H. Immune responses in Paracoccidioidomycosis. A controled study of 16 patients before and after treatment. **Saboraudia**, **16**: 151-163, 1978.
- RESTREPO, A. & VELEZ, H. Effect of phagocytosis in vitro on *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, **13** (1): 1-10, 1975.

- ROSEN, S.D. The LEC-CAMs: an emerging family of cell-cell adhesion receptors based upon carbohydrate recognition. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 3(5): 397-402, 1990.
- RUBINSTEIN, N.; ILARREGUI, J.M.; TOSCANO, M.A. & RABINOVICH, G. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**, **64**: 1-12, 2004.
- SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. & STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, **56**(3): 711-713, 1988.
- SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, **31** (2): 99-113, 1993.
- SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorfism. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. & DEL-NEGRO, G. (Eds.). **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994. pp. 49-66.
- SAN-BLAS, G.; SUZUKI, S.; HEARN, V.; PINEL, C.; KOBAYASHI, H.; MENDEZ, C.; NINO, G.; NISHIKAWA, A.; SAN-BLAS, F.; SHIBATA, N.; *et al.* Fungal polysaccharides. **J. Med. Vet. Mycol.** **32** (Suppl 1): 321-328, 1994.
- SANO, H.; HSU, D.K.; APGAR, J.R.; YU, L.; SHARMA, B.B.; KUWABARA, I.; IZUI, S. & LIU, F.T. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J. Clin. Invest.**, **112**: 389-397, 2003.
- SANO, H.; HSU, D.K.; YU, L.; APGAR, J.R.; KUWABARA, I.; YAMANAKA, T.; HIRASHIMA, M. & LIU, F.T. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J. Immunol.**, **165**: 2156-2164, 2000.

- SANO, H. & LIU, F.T. Galectins: another family of chemoattractants? **Mod. Asp.Immunobiol.**, **2** (1): 4-6, 2001.
- SATO, S. & HUGHES, R.C. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. **J. Biol. Chem.**, **269** (6): 4424-4430, 1994.
- SATO, S. & NIEMINEN, J. Seeing strangers and announcing “danger”: galectin-3 in two models of innate immunity. **Glycoconjugate J.**, **19**: 583-591, 2004.
- SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, **268** (1): 74-81, 1993.
- SHARON, N. & LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, **14** (11): 53R-62R, 2004.
- SILVA, C.L.; ALVES, L.M.C. & FIGUEIREDO, F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol.**, **140**: 1189-1194, 1994.
- SILVA-VERGARA, M.L. **Contribuição ao estudo epidemiológico de Paracoccidioidomicose. Isolamento do fungo em amostra de solo e associação com o cultivo de café.** 1996. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 1996.
- SHI, S.R.; KEY, M.E. & KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissues sections. **J. Histochem. and Cytochem.**, **39** (6): 741-748, 1991.
- SOUTO, J.T., FIGUEIREDO, F., FURLANETTO, A., PFEFFER, K., ROSSI, M.A. & SILVA, J.S.S. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α determine resistance to

- Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.** , **156** (5): 1811-1820, 2000.
- SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, A.M.V.C.; KUROKAWA, C.S.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A. & FREIRE-MAIA, D.V. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, **37** (4): 277-284, 1999.
- SWARTE, V.V.; MEBIUS, R.E.; JOZIASSE, D.H.; VAN DEN EIJNDEN, D.H. & KRAAL, G. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, **28**:2864-2871, 1998.
- TRACEY, K.J. & CERAMI, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, **9**: 317-343, 1993.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, **3**: 133-145, 2003.
- TRUONG, M.J., GRUART, V., LIU, F.T., PRIN, L., CAPRON, A. & CAPRON, M. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, **23** (12): 3230-3235, 1993.
- TURNER M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, **17**: 532-540, 1996.
- VILLA-VERDE, D.M.; SILVA-MONTEIRO, E.; JASIULIONIS, M.G.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A.; BRENTANI, R.R.; SAVINO, W. & CHAMMAS, R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. **Eur. J. Immunol.**, **32** (5): 1434-1444, 2002.

- WEIS, W.I.; TAYLOR, M.E. & DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol. Rev.**, **163**: 19-34, 1998.
- YAMAOKA, A.; KUWABARA, I.; FRIGERI, L.G. & LIU, F.T. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. **J. Immunol.**, **154**: 3479-3487, 1995.
- YANG, R.Y., HSU, D.K. & LIU, F.T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93** (13): 6737-6742, 1996.
- ZDERO, M.; PONCE de LEON, P. & NOCITO, I. Parasites found in HIV-seropositive patients. **Medicina (Buenos Aires)**, **53**(5): 408-412, 1993.
- ZUBERI, R.I.; HSU, D.K.; KALAYCI, O.; CHEN, H.Y.; SHELDON, H.K.; YU, L.; APGAR, J.R.; KAWAKAMI, T.; LILLY, C.M. & LIU, F.T. Critical role of galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. **Am. J. Pathol.**, **165** (6): 2045-2053, 2004.

Deletion of the galectin-3 gene in mice results in a higher Th1-polarized response but a higher cyst burden in *Toxoplasma gondii* infection

RUNNING TITLE: The role of galectin-3 in *T. gondii* infection

Emerson Soares Bernardes,^{*} Neide M. Silva,[†] Luciana Pereira Ruas,^{*} Jose Roberto Mineo,[†] Adriano Motta Loyola,[†] Daniel K. Hsu,[‡] Fu-Tong Liu,[‡] Roger Chammas,[§] and Maria Cristina Roque-Barreira^{2*}

^{*} Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 14.049.900, Brazil; [†] Department of Immunoparasitology, Federal University of Uberlândia-ICBIM-, Uberlândia-MG, 38.400-902, Brazil; [‡] Department of Dermatology, School of Medicine, University of California-Davis, Sacramento, CA, 95817, USA, [§] Laboratory of Experimental Oncology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil.

¹This work was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq). E.S.B. received a scholarship from FAPESP.

²Address correspondence and reprint requests to Dr. Maria Cristina Roque-Barreira, Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Av. dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto – SP – Brazil - CEP. 14049-900. E-mail: mcrbarre@fmrp.usp.br. Phone: 55-16-602-3062 - Fax: 55-16-633-6631

ABSTRACT

Although the pro-inflammatory properties of the animal lectin galectin-3 have been delineated, little is known about the role of this protein in innate immunity. In this study, we have studied galectin-3-deficient ($gal3^{-/-}$) mice with regard to the host response to *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infection. This infection is characterized by a Th-1-polarized immune response, inflammation in the organs affected by the parasites, and accumulation of cysts in the central nervous (CNS) system and muscles. We found that in wild-type mice galectin-3 is highly expressed in the inflammatory cells infiltrating the intestines, liver, lungs, and brain. $Gal3^{-/-}$ mice developed a significantly reduced inflammatory response in all of these organs except the lungs compared to wild-type mice. In addition, $gal3^{-/-}$ mice exhibited a substantially higher number of cysts in the brain. Furthermore, $gal3^{-/-}$ mice mounted a significantly higher Th1-polarized response, manifested by higher IL-12p40 and interferon- γ (IFN- γ) levels as well as a higher ratio of *T. gondii*-specific IgG2a/IgG1 in the sera. Consistent with this, splenic cells from uninfected $gal3^{-/-}$ mice produced higher amounts of IL-12 and IFN- γ when stimulated by lipopolysaccharide and IFN- γ than cells from wild-type mice. Despite these differences, $gal3^{-/-}$ mice and wild-type mice were comparable in their survival rates upon *T. gondii* infection, when the parasites were fed perorally, but the former exhibited a significantly lower survival rate than the latter, when the parasites were given intraperitoneally. We conclude that galectin-3 plays an important role in the innate immune response against *T. gondii* infection in mice. In its absence, mice developed a reduced inflammatory response and higher parasite burden in the CNS, despite a higher Th-1 response.

Key words: Th1 Cells, Parasitic-Protozoan; Cytokines, inflammation

INTRODUCTION

Galectins are a family of animal lectins composed of 15 members that are conserved throughout animal evolution (1-4). They recognize galactose-containing oligosaccharides and share sequence similarities in their carbohydrate-recognition domain. Among the members of the galectin family, galectin-3 is unique since it consists of tandem repeats of short amino acid stretches in the N-terminal region in addition to the C-terminal carbohydrate-recognition (CRD) domain.

In the past few years, the concept that some members of the galectin family might play an essential role in the initiation and amplification of the inflammatory response has emerged, while other members, bearing similar carbohydrate specificity, exert suppressive role in the immune response (8). Thus, galectin-3, has been proposed as a powerful pro-inflammatory molecule, whereas galectin-1, is known to be an anti-inflammatory molecule. However, such concept has been expanded to accommodate contradictory effects exerted by the same galectin, which would depend on multiple factors such as the concentration, the target cell tested and small structural differences among the galectin family members. Therefore, galectin-3, besides being appointed as an anti-apoptotic molecule when intracellularly localized (9), has been recognized as promoting T cell apoptosis, when presented extracellularly (10). In other cell types, this phenomenon is even more complex, as the anti- or pro-apoptotic effects of galectin-3 depend on the subcellular compartment where galectin-3 is found (11). Besides apoptosis, galectin-3 has been implicated in diverse biological processes, including cell activation, cell adhesion modulation and pre-mRNA splicing induction (12-15).

Although galectin-3-deficient mice have been generated (16, 17), these animals show no developmental or morphological abnormalities, and young adult mice have presented no apparent phenotypes under standard laboratory conditions so far. A few studies in gal-3-deficient mice have only focused on the galectin-3 pro-inflammatory activity (16, 17), its role on phagocytosis, a major function of macrophages (18), its role in the airway inflammatory response (Zuberi, et al., 2004), as well as its function as an “advanced glycation end” products receptor (19).

We have used the *Toxoplasma gondii* infection to investigate the immunoregulatory properties of galectin-3, taking advantage of the availability of gal-3-deficient mice. *T.*

gondii is an intracellular parasite that influences host resistance by affecting functions in various immune cell types. Infection control is mediated by a strong inflammatory response, in which IL-12-dependent IFN- γ production plays a crucial role (20, 21). The disease is generally initiated by an acute phase, associated to rapid tachyzoite proliferation. It is followed by a chronic stage, mainly characterized by the presence of latent cysts within the central nervous system and skeletal muscles. Studies using the toxoplasmosis mouse model have clearly demonstrated that resistance is associated to the activation of a strong cell-mediated Th1-type immune response, which courses with high IFN- γ production driven by IL-12 derived from dendritic cells (20, 22). In order to determine whether galectin-3 could participate of this immunoregulation, we have analyzed the role of galectin-3 in the initial events responsible for the induction and regulation of the immune response against the parasite.

In the present study, using experimental *Toxoplasma gondii* infection, we have identified galectin-3 as a modulator molecule that interferes with IL-12 production by competent cells and forces the immune response toward the Th1 phenotype. As IL-12 is a cytokine that bridges innate and adaptive immunity, we hypothesized that galectin-3 may play a role in tuning up both the innate and adaptive responses to different pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

The Galectin-3-deficient ($gal3^{-/-}$) mice were generated as previously described and backcrossed to C57BL/6 mice for nine generations (16, 17). Age-matched wild-type ($gal3^{+/+}$) mice in a background C57BL/6 were used as controls in all the experiments. Mice were housed under approved conditions of the Animal Research Facilities from Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. All of the animals used for the experiments were male 6 to 8 weeks old.

Parasites and antigen preparation

The low-virulent ME-49 strain of *T. gondii* was used to infect animals. Cysts were harvested from the brains of C57BL/6 mice that had been inoculated with approximately 10 cysts through the intraperitoneal (i.p.) route 1-month earlier. For the preparation of *T. gondii* tachyzoite-soluble antigen (STAg), tachyzoites of the RH strain were harvested from the peritoneal cavities of out-bred Swiss Webster mice that had been injected with 10^7 organisms 2 days earlier. The tachyzoites were sonicated and centrifuged, and the supernatant was collected as previously described (25). The Ethics Committee on Animal Research of the University of Sao Paulo approved all procedures performed in the studies described here.

Infection of mice and tissue processing

$Gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice were infected perorally with twenty *T. gondii* cysts (groups of 4 mice each). On 7, 14, 21 and 28 days post-infection, mice were euthanized, the brain, lung, liver, spleen, kidney and small intestine tissue samples were collected, fixed in 10% buffered formalin and processed routinely for paraffin embedding and sectioning. The small intestine was cut into four pieces, and each piece was rolled on itself in order to make a “Swiss roll”. The entire length of the small intestine was examined histologically. For each organ, tissue sections of 4 μ m thickness (40 μ m distance between sections) were mounted on slides for histopathological and immunocytochemical studies. They were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and then observed under optical microscope. In addition, the sections were stained by the immunoperoxidase method for identification and quantification of tissue parasitism.

Immunocytochemistry for detection of galectin-3 and T. gondii-specific antigens from infected and uninfected animals

To detect galectin-3 expression by immunocytochemistry, deparaffinized sections were incubated for 1 hour, in 2% unlabeled goat serum diluted in 1% Bovine Serum Albumin (BSA), to reduce nonspecific binding. The slides were then incubated with rat anti-mouse galectin-3 mAb (M3/38) (26) diluted in 1% BSA for one hour. The secondary antibodies labeled with peroxidase were goat anti-rat IgG antibodies (Sigma Chem Co., St. Louis, MO). The reaction was visualized by incubating the section with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Amresco, Solon, OH) for 5 min. In the control slides, normal rat IgG replaced the primary antibody. The slides were studied with an Olympus microscope and photographed with Kodak film (100 ASA). All steps were performed at room temperature.

To detect specific parasite antigen, deparaffinized sections were incubated for 30 min, at 37°C, in 2% normal sheep serum, to reduce nonspecific binding. They were then incubated with polyclonal rabbit antibody against the whole parasites of the RH strain of *T. gondii* (total antigen parasite) at 4°C, overnight. The secondary antibodies were biotinylated sheep anti-rabbit antibodies. The sensitivity was improved with the avidin-biotin technique (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). The reaction was revealed as described above. In the control slides, normal rabbit IgG replaced the primary antibody.

Histological analysis

The tissue parasitism detected by immunocytochemistry was scored by counting the total number of cyst-like structures and tachyzoites in 40 microscopic fields (1x400) per histopathological section (40 µm distance between sections). In order to score the inflammatory infiltration in the liver, the inflammatory foci were quantified in two noncontiguous sections (40 µm distance between them) from each mouse, in 40 fields (magnification, 1 X 400), in a blind manner by two researchers. The inflammatory infiltrates in the lung and small intestine tissues were graded as +, mild; ++, moderate; +++, severe and ++++, very severe; according to inflammatory cell infiltration within

the alveolar walls in the lung and in the lamina propria (LP), epithelium and submucosa in the intestine. The presence of necrotic areas was also analyzed in the small intestine. For comparison of the pathology in the brain of the $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice infected with the ME-49 strain of *T. gondii*, the development of encephalitis was scored in sagittal sections by analyzing the presence of inflammatory cells scattered in the parenchyma and in the meninges, and the cuffing of blood vessels by inflammatory cells. The glial nodules were also counted. The inflammatory infiltrate was subdivided into focal (glial nodules) and diffuse, depending on how close the inflammatory cells were associated. The pathologic changes were scored on an arbitrary scale. The inflammatory response was graded as mild, +, if there were 1-15 foci of glial nodules; as moderate, ++, if there were 16-40 foci; as severe, +++, if there were 40-50 foci, and as very severe, +++, if there were more than 50 foci of glial nodules.

Spleen cell cultures

ME-49 *T. gondii*-infected $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice were euthanized 7, 14, 21 and 28 days post-infection and their spleens were removed. The spleen cells suspensions were washed in RPMI medium and treated for 2 min with lysing buffer (9 volumes of 0.16 M NH_4Cl and 1 volume of 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5). The erythrocyte-free cells were then washed three times and adjusted to 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. The cell suspension was distributed (1.0 mL/well) in a 24-well tissue culture plate, at 37°C, in 5% CO_2 , and STAg (5 μ g/mL) was added to each well. Spleen cells from uninfected mice were also used and treated with lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) (5 μ g/mL), Interferon-gamma (IFN- γ) (BD PharMingen, San Diego, CA) (10 ng/mL) or LPS + IFN- γ . The culture supernatants were collected after 48 hours for IL-12p40 and IFN- γ determination using a sandwich ELISA, described below.

Cytokine measurement

IL-12p40, IFN- γ , IL-4 and IL-10 in serum and total spleen cell supernatant were quantified with a commercially available kit, according manufacturer's instructions (OptEIA set; Pharmingen, San Diego, CA). Cytokine concentrations were determined

by comparison with standard curves constructed with known amounts of respective mouse recombinant cytokines. The sensitivity limits of the assays were 15 pg/mL for IL-12p40, 7 pg/mL for IL-4, and 30 pg/mL for IFN- γ and IL-10.

Quantification of parasite-specific IgG1 and IgG2a

For the determination of Ig production, polystyrene Montegotto Terme Padova Italy (Italy) enzyme-linked immunosorbent assay plates were covered overnight, at 4°C, with 10 μ g/mL of *T. gondii* antigen diluted in carbonate-bicarbonate buffer (0.1 mol/L, pH 9.6). Serum samples from individual animals were diluted 1:10 in PBS-0.05% Tween 20 containing 5% nonfat milk (Molico, Nestlé) (PBS-T-M), and they were incubated for 1 hour, at 37°C. Subsequently, nonconjugated rabbit anti-mouse IgG1 or IgG2a diluted 1:10 in PBS-T-M was added to each well and the plates were incubated for 1 hour, at 37°C. For the detection of anti-IgG1 and IgG2a antibodies, a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:100) was incubated for 1 hour, at 37°C. The assay was developed with the TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) Substrate Kit according to the manufacturer's instructions (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). The reaction was stopped 15 min later by addition of 1 M sulfuric acid to each well. The absorbance was read at 450 nm in a Microplate Scanning Spectrophotometer (PowerWave_x, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). The cut-off for a positive test was determined as the mean OD for the negative control plus three standard deviations. Antibody titers were arbitrarily expressed as ELISA Indexes (EI), according to modifications to the method of Turunen *et al.* (29), as follows: $EI = (OD_{\text{sample}}/OD_{\text{cut-off}})$, where values of $EI \geq 1.0$ were considered as cut off titers.

Statistical analysis

Levels of significance between groups of mice were determined using the nonparametric Kruskal-Wallis test for mortality with ordination means compared by the Student's *t* test. Statistical determinations of the difference between the means of experimental groups for the quantification of parasites and pathological changes and the differences between the immunoglobulin isotypes levels were performed using variance analysis and an unpaired, two-tailed Student's *t* test. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Galectin-3 is up-regulated in various tissues in response to T. gondii infection

We investigated whether the galectin-3 expression was up-regulated in response to *T. gondii* infection. For this purpose, the peripheral organs (intestine, liver, spleen, and lungs) and the brain from orally infected mice were evaluated by immunocytochemistry for galectin-3 on days 7, 14, 21 and 28 post-infection, and compared with uninfected mice. Regarding the peripheral organs, galectin-3 was detected at low levels in tissues from uninfected mice (Fig. 1A, B). However, by day 7 post-infection, the staining substantially increased (data not shown) and remained high until day 14, coinciding with the high inflammatory infiltration in the organs (Fig. 1D, E). The increased staining was localized on the infiltrating cells. On day 28 when the parasite could not be detected in the peripheral tissues, the galectin-3 staining decreased and reached levels close to those observed in uninfected mice (Fig. 1G, H).

Galectin-3 staining was absent in the brain from uninfected mice (Fig. 1C). However, high galectin-3 staining was detected on days 14, 21, and 28 post-infection (Fig. 1F, I, for day 14 and 28, respectively). The increase in the galectin-3 staining coincides with the presence of the parasites in the brain and is localized on the infiltrating cells. As expected, tissue sections from the $gal3^{-/-}$ mice were not stained by the anti-galectin-3 antibody (data not shown).

Gal3^{-/-} mice have a milder inflammatory response but a similar parasite burden in the intestine compared to gal3^{+/+} mice

Since oral infection by *T. gondii* is typically followed by the proliferation of parasites in the small intestine (31), and because susceptibility of C57BL/6 mice to oral infection is partially attributed to the necrosis of the small intestinal villi (32), we compared the tissue parasitism and the inflammatory response in the small intestine of the infected mice. In both $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice, lesions of the small intestine were more clearly detectable from day 6 to 8 post-infection. Histological analysis of the small intestine from $gal3^{+/+}$ mice on day 6 revealed increasing thickness of the villi and leukocyte infiltration into lamina propria (LP) of the ilea (Fig. 2A), whereas only a mild leukocyte infiltration was observed in $gal3^{-/-}$ mice (Fig. 2B). In addition, necrosis of the villi was

noted in $gal3^{+/+}$ mice 6 days after infection (Fig. 2A), whereas no such lesions were detected in $gal3^{-/-}$ mice (Fig. 2B). On day 8 after infection, large necrotic areas were observed in the ilea of the $gal3^{+/+}$ mice, predominantly within the villi and some villi were completely destroyed (data not shown). The inflammatory reaction progressively decreased in both $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice after 8 days of infection (Fig. 3A). Despite the marked difference in the inflammatory response, there was no significant difference in the parasite burden in the small intestine, between $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice (data not shown).

Gal3^{-/-} mice have a lower inflammatory response in the liver but a higher inflammatory response in the lungs compared to gal3^{+/+} mice.

It is known that the parasite disseminates through the blood vessels to other organs after reaching the small intestine (31). We thus compared the inflammatory reaction in the liver and lungs of the $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice. As summarized in Fig. 3B, the inflammatory reaction in the liver was less intense in $gal3^{-/-}$ mice on days 14, 21 and 28. Representative histochemical photos of the liver of $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice are presented in Fig. 2C, D. A different picture was noted regarding the lungs, where a similar inflammatory infiltration was detected between the two genotypes, during the first two weeks of infection, but in the following two weeks, the inflammation progressively decreased in $gal3^{+/+}$ mice but persisted in $gal3^{-/-}$ mice (Fig. 2F). Thus, on day 21, there were significantly higher inflammatory infiltrates in $gal3^{-/-}$ mice compared to $gal3^{+/+}$ mice (Fig. 3C).

The central nervous system of gal3^{-/-} mice has a delayed inflammatory response and higher parasite burden

Tachyzoites reach the brain around 7-9 days after infection (33), where they are converted into bradyzoites, culminating with the formation of cysts that remain for the whole life of the host. We thus next investigated the parasitism and the inflammatory response in the brain. As shown in Fig. 3D, the inflammation exhibited by $gal3^{-/-}$ mice during the first 3 weeks of infection was lower than $gal3^{+/+}$ mice. However, by 28 days post-infection, the inflammation was comparable between the two genotypes.

Analysis on day 7 post-infection revealed few free tachyzoites in the brain of both $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice. Remarkably, 14 days after infection, the number of cyst in $gal3^{-/-}$

$^{-/-}$ mice was 11 times higher than that in $gal3^{+/+}$ mice (Fig. 4A,B,C). The cysts were more numerous in $gal3^{-/-}$ mice during all the experimental period, although the ratio between the numbers detected in $gal3^{-/-}$ and $gal3^{+/+}$ mice decreased to 6 on day 21, and to 3 on day 28 (Fig. 4C).

*The mortality rate of $gal3^{-/-}$ mice is comparable to that of their wild-type counterpart when orally infected with *T. gondii*, but is lower when intraperitoneally infected*

We next compared the outcome of the *T. gondii* infection in $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice, both in the C57BL/6 background, which is known to be susceptible to *T. gondii* infection (30). For this purpose, mice inoculated perorally with 20 cysts of the ME-49 strain of *T. gondii* were monitored for survival. Both $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice survived for at least 30 days after infection, but started dying thereafter (Fig. 5A). There was no difference in survival out to 100 days between the two genotypes. However, $gal3^{-/-}$ mice exhibited significantly lower survival rates than $gal3^{+/+}$ mice when infected intraperitoneally ($P < 0.027$) (Fig. 5B). The results suggest that, depending on the route of infection; galectin-3 contributes to the overall susceptibility of mice to *T. gondii* infection.

$Gal3^{-/-}$ mice mount a higher Th1 immune response compared to $gal3^{+/+}$ mice

It is known that *T. gondii* induces a strong interleukin (IL)-12-dependent cell-mediated immune response that restrains the replication of tachyzoites and that resistance to parasites is associated with an IFN- γ -dependent response triggered by IL-12 (20). We thus assessed the Th1 cytokine concentrations in the serum. Interestingly, the concentrations of IL-12p40 and IFN- γ were significantly higher in the sera of $gal3^{-/-}$ mice, compared to those of $gal3^{+/+}$ mice (Fig. 6A,B). To corroborate the finding of the exaggerated Th1-type immune response in $gal3^{-/-}$ mice, we measured the ratio of IgG2a to IgG1 antibodies specific for *T. gondii* antigens in the plasma from infected $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice. Consistent with a heightened Th1 response, $gal3^{-/-}$ mice exhibited a higher IgG2a/IgG1 ratio (Fig. 6C).

We also cultured spleen cells from the infected mice and assayed for the cytokine production. $Gal3^{-/-}$ cells were found to release higher amounts of IL-12p40 at all time points even in the absence of stimulation (Fig. 7A). In addition, $Gal3^{-/-}$ cells released higher levels of IFN- γ up to day 14 post-infection and, the levels of this cytokine

became under the limit of detection in both genotypes thereafter. In contrast, the two genotypes did not differ in the IL-10 levels (data not shown); the IL-4 levels were under the limit of detection.

To determine whether the high production of Th1-type cytokines by the $gal3^{-/-}$ spleen cells was specific to *T. gondii* infection or reflected an intrinsic defect due to galectin-3 deficiency, we compared the cytokine production by spleen cells from uninfected $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice after stimulation with LPS and IFN- γ . As shown in Fig. 8, the $gal3^{-/-}$ spleen cells produced markedly higher levels of IL-12p40 and IFN- γ .

DISCUSSION

Data presented herein indicate that KO mice do not show enhanced susceptibility to *T. gondii* infection despite presenting a higher parasite burden in the brain. To compensate the absence of galectin-3, a new balance in the host-parasite relationship is attained, and reveals novel mechanisms by which galectin-3 might interfere with the immune system modulation. While a delayed inflammatory response seen in the KO mice may be responsible for the parasite spreading, an overproduction of IL-12 can favor the development of an amplified Th1-type immune response. Thus, the higher levels of IFN- γ and specific antibodies may counterbalance the deficit in the inflammatory response determined by the absence of galectin-3. In conclusion, galectin-3 would play an immunoregulatory role on immunity through influencing DC IL-12 production, which has profound effects on the development of an effective adaptive immune response against pathogens.

The results reported in this work corroborate with the galectin-3 pro-inflammatory role and also provide evidences that galectin-3 is a tuner of the immune system, able to exquisitely adjust the intensity of the immune response by regulating the development of an adequate innate response and dictating the development of an adequate adaptive response. Indeed, previous studies of peritonitis induction in gal-3-deficient mice have already provided significant support for the pro-inflammatory role of this lectin. After injection of a non-infectious inflammatory agent, thioglycollate, gal-3-deficient mice exhibited a significantly reduced number of granulocytes in the peritoneal cavity (17, 18). In our experimental model, when challenged with the infectious agent *Toxoplasma gondii*, gal-3-deficient mice exhibit a deficient inflammatory response in the small intestine, liver and CNS during acute infection. It has been reported that the susceptibility of C57BL/6 mice to *T. gondii* infection is in part due to a strong inflammatory response developed against the parasite in the small intestine, which causes severe local necrosis (32). As the deficient inflammatory response in gal-3-deficient mice does not influence the small intestine parasite burden, we hypothesize that, in the absence of galectin-3, the milder inflammation is beneficial to the host, avoiding tissue damage and contributing to their survival. In agreement with this hypothesis, it has also been reported that *T. gondii*-infected IL-10-deficient mice succumbed during early infection as a consequence of the increased frequency and intensity of cellular infiltration and tissue necrosis, rather than of uncontrolled parasite

growth (35). Also, while production of nitric oxide (NO) is believed to be an important microbicidal mechanism against most intracellular pathogens, iNOS-deficient mice that are unable to produce NO, upon challenge with *T. gondii*, had prolonged survival, when compared with normal controls (36). Even though iNOS-deficient mice presented an uncontrolled dissemination of the parasite, these mice showed few pathological changes to their liver and gut, whereas extensive necrosis of small intestine was seen in the controls.

In contrast with other peripheral organs, the lung from gal-3-deficient mice exhibits an inflammatory reaction similar to that seen in the WT lung at the early phase, but it becomes stronger during the late phase of infection, indicating that other mechanisms are involved in the emigration of inflammatory cells into the lung. However, since the parasite was already eliminated from the lung at day 28 post-infection (data not shown), further studies should be taken to elucidate the mechanism of such a late hyper responsiveness.

Several reports have suggested that galectin-3 may play a role on adaptive immunity but, to date, no one has clearly demonstrated how galectin-3 would tune up both the innate and adaptive immune responses. The idea that galectin-3 can interfere with the adaptive response has so far been based on: (1) the fact that the inhibition of galectin-3 by an antisense strategy blocked proliferation of TCR-stimulated T lymphocytes (43); (2) its anti-apoptotic role, interfering in T cell function (32); (3) its potential role in allergic inflammation, specifically inhibiting IL-5, a Th2-type cytokine, in human eosinophils (44); (4) its role in the macrophage homeostasis (14, 15) and; (5) its role in promoting dendritic cell/naïve T lymphocyte interaction (45). However, the first data suggesting an alternative role for galectin-3 on adaptive immunity came from studies with mice that were deficient in UDP-N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5), which accounts for the production of *N*-glycans intermediates that are elongated with poly N-acetyllactosamine and create ligands for galectins (46). These mice showed increased TCR activation, susceptibility to autoimmune disease and enhanced Th1 response, attributed to the impossibility to form multivalent lattice of galectin-3 and *N*-glycans on the TCR complex. Such lattice has been implicated in down-modulating T-cell activation threshold by inhibiting TCR recruitment into the immune synapse. Thus, surface galectin-3-glycoprotein lattices would play an inhibitory role by maintaining the baseline of immunity in the OFF state, besides limiting the development of exacerbated immune response and autoimmune process. Indeed, in our experimental model, we have

demonstrated that *T. gondii*-infected gal-3-deficient mice mounted an amplified Th1-type immune response, which would imply that the absence of galectin-3 could exclusively alter the activation threshold of gal-3-deficient cells. However, unlike the Mgat5 model, we did not detect significant differences between the gal-3-deficient and WT mice regarding *T. gondii* antigen-induced T-cell proliferation rates (unpublished results). According to our model, in a very recent report using a murine model of asthma, Zubery & cols (2004) showed that gal-3-KO mice developed a lower Th2 response but a higher Th1 response compared to the WT mice, which led the authors to suggest that galectin-3 regulates both Th1 and Th2 response. In addition, they found higher levels of antigen-specific IgG2a (a Th1 antibody) in gal-3-KO mice, corroborating with the hypothesis of enhanced Th1 response. Also, in our study we found higher levels of IgG2a in gal-3-KO mice, however, as the parasite elimination from the CNS does not rely on antibodies, the higher parasite load exhibited by the gal-3-deficient mice was due to other galectin-3-mediated mechanisms.

We have shown here, for the first time, that galectin-3 interferes with IL-12 production by competent cells and that the higher levels of Th1 cytokines produced by spleen cells from uninfected gal-3-deficient mice upon unspecific stimulation suggested that other galectin-3-mediated mechanisms are implicated in such Th1 deviation.

In summary, our data have raised up the concept that galectin-3 might play an important role on immunity and dictates the development of Th1/Th2 response through IL-12 modulation. Galectin-3 would act in the regulatory loops controlling Th1 cytokine production and avoiding the development of an exacerbated adaptive immune response. This information may contribute to the design of novel therapeutic interventions in autoimmune, inflammatory and parasitic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We Thank Vani M.A. Correa, Izilda R. Violante, Sandra M.O. Thomáz, Patrícia E. Vendrúscolo and Lísia M. Esper for excellent technical assistance; and Júlio A. Siqueira, Sávio H.F. Miranda and Ednelson A. Mazzotto for expert animal care. We also thank Dr. Júlio Aliberti for helpful discussions.

REFERENCES

1. Barondes, S. H., D. N. W. Cooper, M. A. Gitt and H. Leffler. 1994. Galectins structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 269:20807.
2. Kasai, K., and J. Hirabayashi. 1996. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem. (Tokyo)* 119:1.
3. Hughes, R. C. 1997. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem. Soc. Trans.* 25:1194.
4. Leffler, H., S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian and F. Poirier. 2004. Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19:433.
5. Massa, S. M., D. N. Cooper, H. Leffler, and S. H. Barondes. 1993. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry* 32:260.
6. Liu, F-T. 2000. Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin. Immunol.* 97:79.
7. Hughes, R. C. 2001. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83: 667.
8. Rabinovich, G. A., M. A. Toscano, J. M. Ilarregui, and N. Rubinstein. 2004. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj. J.* 19:565.
9. Yang, R-Y., D. K. Hsu, and F-T. Liu. 1996. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6737.
10. Fukumori. T., Y. Takenaka, T. Yoshii, H. R. Kim, V. Hogan, H. Inohara, S. Kagawa, and A. Raz. 2003. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 63:8302.
11. Califice, S., V. Castronovo, M. Bracke, and F. van den Brule. 2004. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs. tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 23:7527.

12. Perillo, N. L., M. E. Marcus, and L. G. Baum. 1998. Galectins: Versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med.* 76: 402.
13. Yang, R-Y., D. K. Hsu, and F-T. Liu. 1996. Expression of galectin-3 modulates T cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6737.
14. Akahani, S., P. Nangia-Makker, H. Inohara, H. R. C. Kim, and A. Raz. 1997. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 57:5272.
15. Dagher, S. F., J. L. Wang, and R. J. Patterson. 1995. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92:1213.
16. Colnot, C., M-A. Ripoche, G. Milon, X. Montagutelli, P. R. Crocker, and F. Poirier. 1998. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* 94:290.
17. Hsu, D. K., R-Y. Yang, L. Yu, Z. Pan, D. R. Salomon, W-P. Fung-Leung, and F-T. Liu. 2000. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 156:1073.
18. Sano, H., D. K. Hsu, J. R. Apgar, L. Yu, B. B. Sharma, I. Kuwabara, S. Izui, and F-T. Liu. 2003. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J. Clin. Invest.* 112:389.
19. Iacobini, C., S. Menini, G. Oddi, C. Ricci, L. Amadio, F. Pricci, A. Olivieri, M. Sorcini, U. Di Mario, C. Pesce, and G. Pugliese. 2004. Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor. *FASEB J.* 18:1773.
20. Gazzinelli, R. T., S. Hieny, T. A. Wynn, S. Wolf, and A. Sher. 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6115.
21. Yap, G. S., and A. Sher. 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201:240.
22. Sousa, C. R., S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, and A. Sher. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40

- ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186:1819.
23. Aliberti, J. C., M. A. Cardoso, G. A. Martins, R. T. Gazzinelli, L. Q. Vieira, and J. S. Silva. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64:1961.
 24. Yap, G., M. Pesin, and A. Sher. 2000. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN- γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 165:628.
 25. Gazzinelli, R. T., S. Hakin, S. Hieny, G. Shearer, and A. Sher. 1991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 146:286.
 26. Ho, M. K., and T. A. Springer. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 128:1221.
 27. Crowley, M., K. Inaba, M. Witmer-Pack, and R. M. Steinman. 1989. The cell surface of mouse DC: FACS analyses of DC from different tissues including thymus. *Cell. Immunol.* 118:108.
 28. Uzonna, J. E., R. S. Kaushik, Y. Zhang, J. R. Gordon, and H. Tabel. 1998. Experimental murine *Trypanosoma congolense* infections. II. Role of splenic adherent CD3+Thy1.2+ TCR-alpha beta- gamma delta- CD4+8- and CD3+Thy1.2+ TCR-alpha beta- gamma delta- CD4-8- cells in the production of IL-4, IL-10, and IFN-gamma and in trypanosome-elicited immunosuppression. *J. Immunol.* 161:6189.
 29. Turunen, H. K., A. Vuorio, P. O. Leinikki. 1983. Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Scand. J. Infect. Dis.* 15:307
 30. Kobayashi, M., F. Aosai, H. Hata, H. S. Mun, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and A. Yano. 1999. *Toxoplasma gondii*: difference of invasion into tissue of digestive

organs between susceptible and resistant strain and influence of IFN-gamma in mice inoculated with the cysts perorally. *J. Parasitol.* 85:973.

31. Liesenfeld, O. 2002. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.* 185:96.
32. Liesenfeld, O., J. Kosek, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1996. Association of CD4⁺ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 184:597.
33. Silva, N. M., W. L. Tafuri, J. I. Alvarez-Leite, J. R. Mineo, and R. T. Gazzinelli. 2002. *Toxoplasma gondii*: the in vivo expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNF receptor and inducible nitric oxide synthase functions. *Microbes Infect.* 4:261.
34. Silva, N. M., C. V. Rodrigues, M. M. Santoro, L. F. Reis, J. I. Alvarez-Leite, and R. T. Gazzinelli. 2002. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect. Immun.* 70:859.
35. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharton-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Muller, G. Trinchieri, and A. Sher. 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* 157:798.
36. Khan, I. A., J. D. Schwartzman, T. Matsuura, and L. H. Kasper. 1997. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13955.
37. Burns, A. R., C. W. Smith, and D. C. Walker. 2003. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol. Rev.* 83:309.
38. Sano, H., D. K. Hsu, L. Yu, J. R. Apgar, I. Kuwabara, T. Yamanaka, M. Hirashima, and F-T. Liu. 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165:2156.

39. Liu, F-T., D. K. Hsu, R. I. Zuberi, I. Kuwabara, E. Y. Chi, W. R. Jr. Henderson. 1995. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* 147:1016.
40. Yamaoka, A., I. Kuwabara, L. G. Frigeri, and F-T. Liu. 1995. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J. Immunol.* 154:3479.
41. Sato, S., and J. Nieminen. 2004. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj. J.* 19:583.
42. Matzinger, P. 2002. An innate sense of danger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961:341.
43. Joo, H. G., P. S. Goedegebuure, N. Sadanaga, M. Nagoshi, W. von Bernstorff, and T. J. Eberlein. 2001. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 69:555.
44. Cortegano, I., V. del Pozo, B. Cardaba, B. de Andres, S. Gallardo, A. DelAmo, I. Arrieta, A. Jurado, P. Palomino, F-T. Liu, and C. Lahoz. 1998. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J. Immunol.* 161:385.
45. Swarte, V. V., R. E. Mebius, D. H. Joziassse, D. H. van den Eijnden, and G. Kraal. 1998. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28:2846.
46. Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin, and J. W. Dennis. 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409:733.
47. Acosta-Rodríguez, E. V., C. L. Montes, C. C. Motrán, E. I. Zuniga, F-T. Liu, G. A. Rabinovich and A. Gruppi. 2004. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 172:493.
48. Bastos, K. R., C. R. Marinho, R. Barboza, M. Russo, J. M. Alvarez, and M. R. D'Imperio Lima. 2004. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect.* 6:630.
49. Vray, B., I. Camby, V. Vercruysse, T. Mijatovic, N. V. Bovin, P. Ricciardi-Castagnoli, H. Kaltner, I. Salmon, H. J. Gabius, and R. Kiss. 2004. Up-regulation

of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology* 14:647.

50. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
51. Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183.
52. Aliberti, J., D. Jankovic, and A. Sher. 2004. Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol. Rev.* 201:26.
53. d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 191:1661.
54. de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh, and M. L. Kapsenberg. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells *in vitro* with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* 168:1704.
55. Whelan, M., M. M. Harnett, K. M. Houston, V. Patel, W. Harnett, and K. P. Rigley. 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J. Immunol.* 164:6453.
56. Rothoef, T., A. Gonschorek, H. Bartz, O. Anhenh, and U. Schauer. 2003. Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells. *Immunology* 110:430.
57. Holt, P. G., J. Oliver, N. Bilyk, C. McMenamin, P. G. McMenamin, G. Kraal, and T. Thepen. 1993. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* 177:397.
58. Constant, S. L., J. L. Brogdon, D. A. Piggott, C. A. Herrick, I. Visintin, N. H. Ruddle, and K. Bottomly. 2002. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. *J. Clin. Invest.* 110:1441.

59. Zuberi, R. I., D. K. Hsu, O. Kalayci, H. Y. Chen, H. K. Sheldon, L. Yu, J. R. Apgar, T. Kawakami, C. M. Lilly, and F-T. Liu. 2004. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am. J. Pathol.* 165:2045.

Figure Legends

Figure 1. Immunocytochemistry staining for galectin-3 in organs of control or *T. gondii*-infected WT mice. The photomicrographs depict galectin-3 immunostaining (brown color) with an hematoxylin counterstain. In uninfected mice, few cells in the liver (A) and spleen (B) expressed galectin-3 and galectin-3 staining was barely noted in the brain (C). On day 14 following *T. gondii* infection, galectin-3 is expressed by a great number of inflammatory cells in the liver (D), spleen (E) and brain (F). On day 28 following *T. gondii* infection, the level of galectin-3 expression in the liver (G) and spleen (H) almost declined to the basal levels, but remained high in the brain (I). All photomicrographs are under magnification with x40 objective. Circles show inflammatory foci and arrows point to galectin-3-expressing cells.

Figure 2. Histopathology and inflammatory response in tissues of *T. gondii*-infected $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice. Mice were infected with 20 cysts of the ME-49 strain of *T. gondii*, and histological studies were performed on their intestine, liver and lung, at several intervals post-infection. A and B, the intestine of $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice, respectively, showed initial stages of tissue necrosis accompanied by an increased number of inflammatory cells in the lamina propria and submucosa on day 6 (A). In contrast, $gal3^{-/-}$ mice exhibited a preserved villous architecture on day 6 (panel B). C and D, the liver of $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice, respectively, day 14 post-infection; the inflammatory foci (ellipses) are circled. E and F, the lung of $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice, respectively, day 28 post-infection. (H&E; A,B,E,F: under magnification with x10 objective; C,D: under magnification with x60 objective).

Figure 3. Summary of the inflammatory response kinetics in the peripheral organs and CNS of *T.gondii*-infected gal3^{+/+} and gal3^{-/-} mice. Panels A (Intestine), B (Liver), C (Lung) and D (CNS) show the evolution of inflammatory response at several intervals post-infection. The inflammatory scores were measure as described in Materials and Methods.

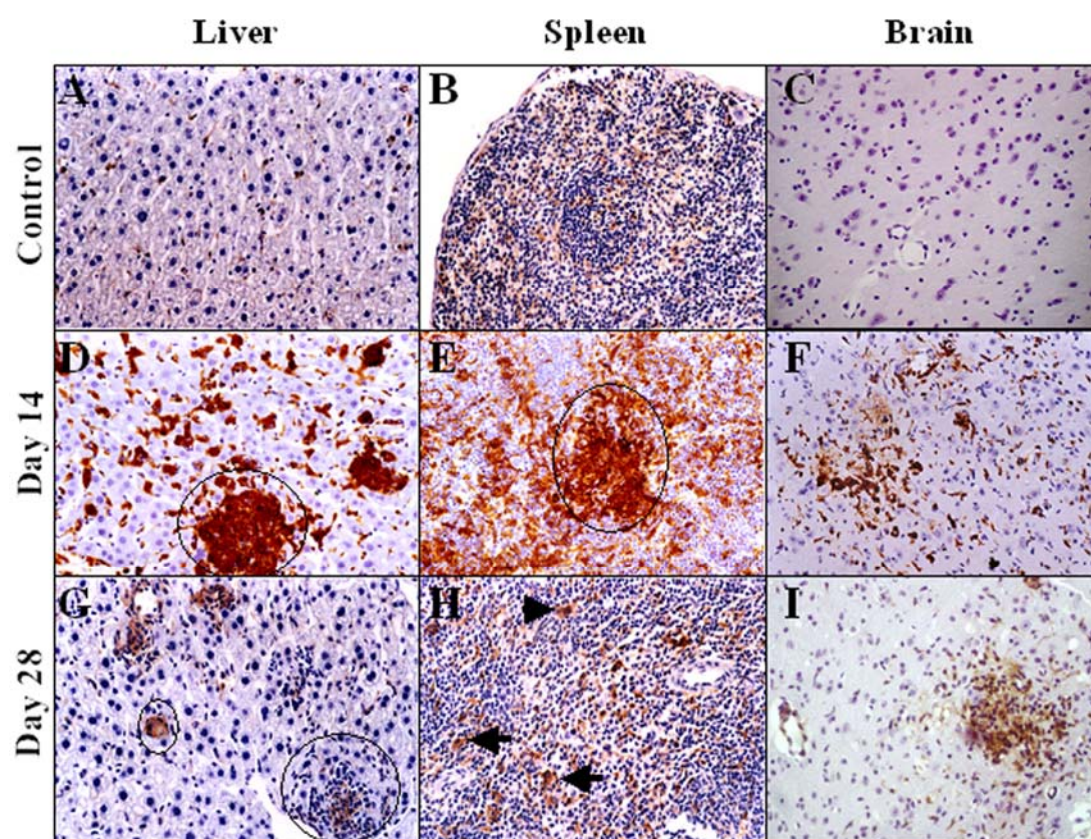
Figure 4. Parasite burden in the brain of *T. gondii*-infected gal3^{+/+} and gal3^{-/-} mice. Mice were perorally infected with 20 cysts of the ME-49 strain of *T. gondii*. In painel A and B, arrows and ellipse points to cysts in the brain of gal3^{+/+} and gal3^{-/-} mice, respectively, day 14 post-infection (parasite-specific immunocytochemistry; A, B: under magnification with x40 objective). In painel C, the number of cysts was examined in brain sections of *T. gondii*-infected gal3^{+/+} and gal3^{-/-} mice during the course of the infection. Four mice from each strain were examined for each time point. *Significantly different from values obtained from the WT mice ($p < 0.03$). Similar results were obtained in two experiments.

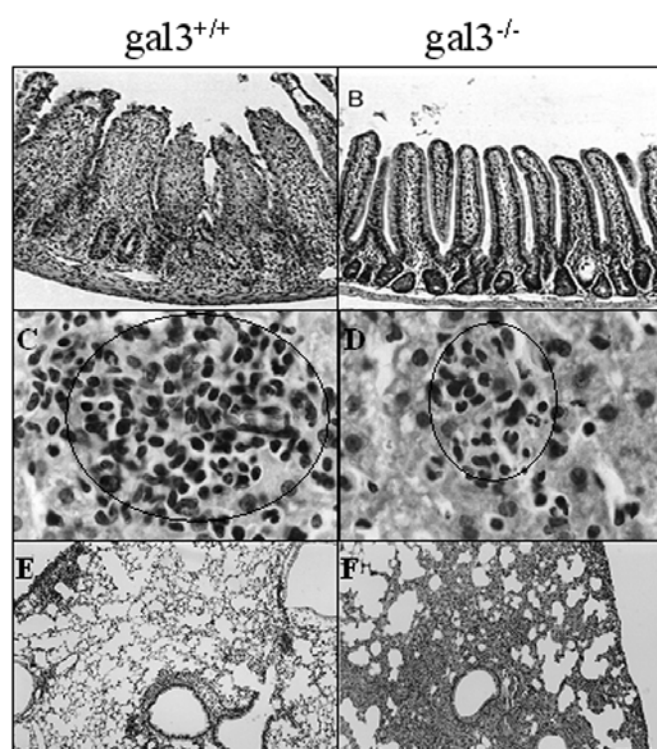
Figure 5. Survival of gal3^{+/+} and gal3^{-/-} mice to *T. gondii* infection. Mice were perorally (Painel A) or intraperitoneally (paineil B) infected with 20 cysts of the ME-49 strain of *T. gondii* and survival was monitored. Data are representative of three experiments performed, each with five to eight mice per group, which yielded similar results. The results are expressed as % of live animals during the course of the infection.

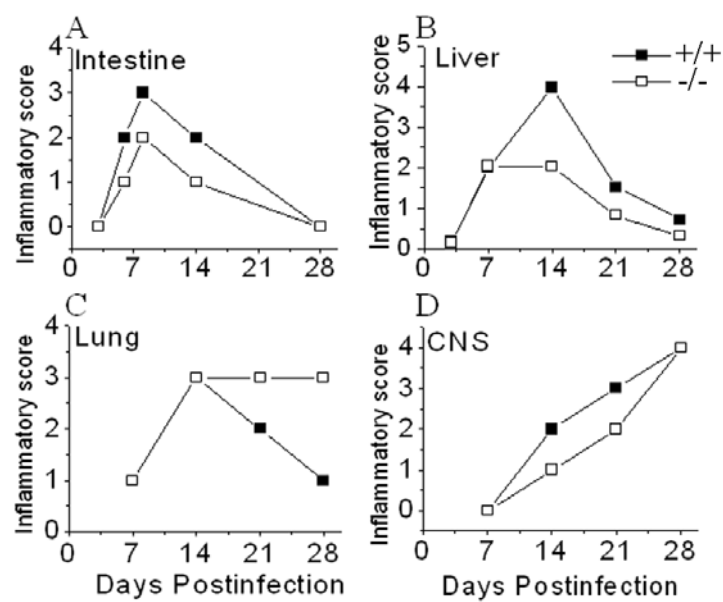
Figure 6. Levels of IL-12p40 and IFN- γ and ratio of parasite-specific IgG2a to IgG1-isotype in sera of *T. gondii*-infected mice. The serum samples were collected on day 14 post-infection. IL-12p40 (A), IFN- γ (B) and IgG2a/IgG1 (C) levels were assayed by ELISA. In painel C, the IgG2a and IgG1 isotype antibodies levels were measured in the sera samples of gal3^{+/+} and gal3^{-/-} mice on day 14 post-infection. The results represent the mean $\pm$ SD of data from 5 mice of each genotype. Similar results were obtained in three experiments.

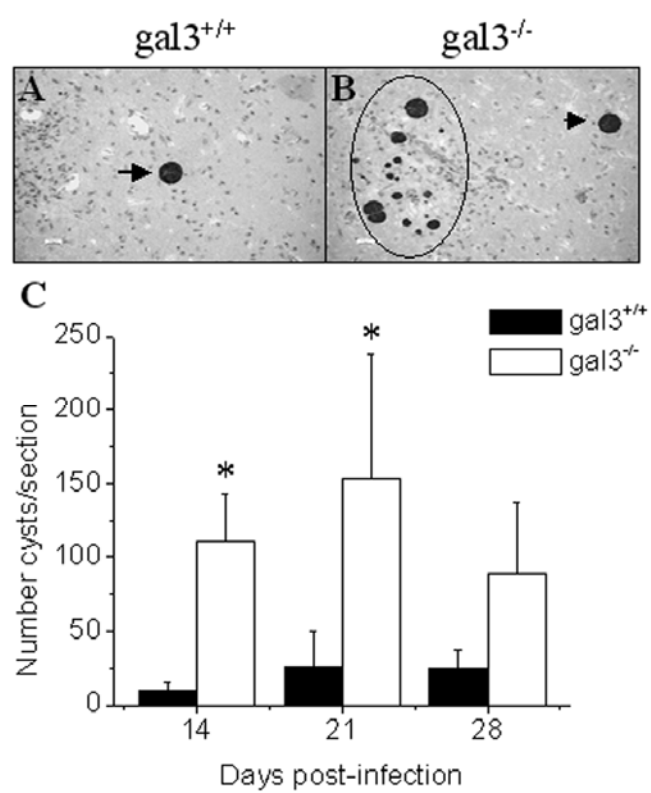
Figure 7. Levels of IL-12 p40 in the spleen cell supernatants from *T. gondii*-infected mice. Spleen cells, harvested on days 7, 14, 21 and 28 post-infection, were incubated with medium alone (B) or stimulated with *T. gondii* tachyzoite-soluble antigen (STAg) (C). After 48 hours, the supernatants were collected and assayed for IL-12 p40 by ELISA. The results represent the mean $\pm$ SD of triplicate cultures from a representative experiment. *, $p < 0.02$. The difference in the responses between $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice are significantly different throughout the entire period ($p < 0.05$). Experiment was performed two times with similar results.

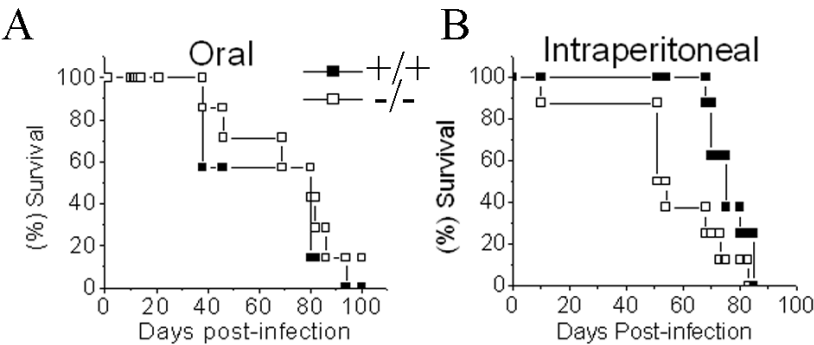
Figure 8. IL-12p40 and IFN- γ production by spleen cells from uninfected $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice. Total cells isolated of the spleen from uninfected $gal3^{+/+}$ and $gal3^{-/-}$ mice were cultured for 48 hours, in the presence or absence of LPS, IFN- γ or LPS + IFN- γ . The IL-12p40 (A) and IFN- γ (B) concentrations in the culture supernatants were measured by ELISA. Spleen cells of $gal3^{-/-}$ mice produced higher IL-12p40 (Panel A) and IFN- γ (Panel B) levels compared to $gal^{+/+}$ mice. The results represent the mean $\pm$ SD of triplicate cultures from a representative experiment.

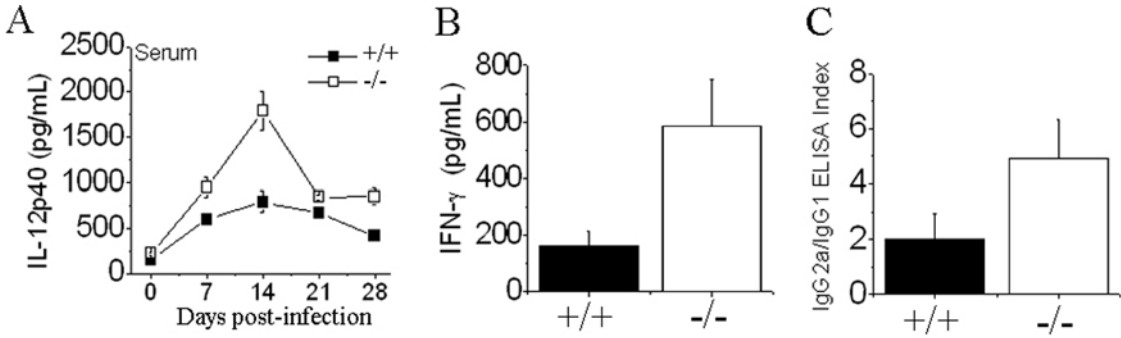


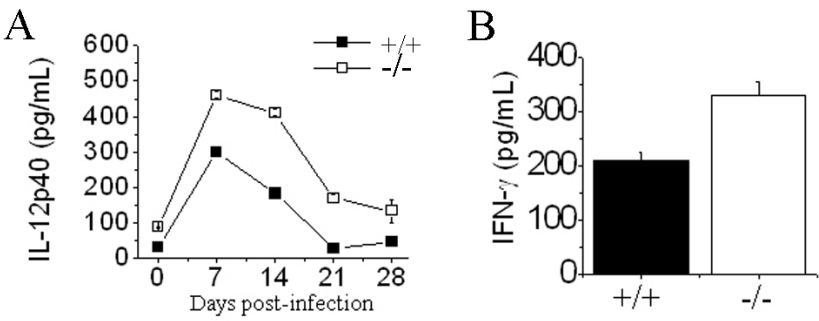


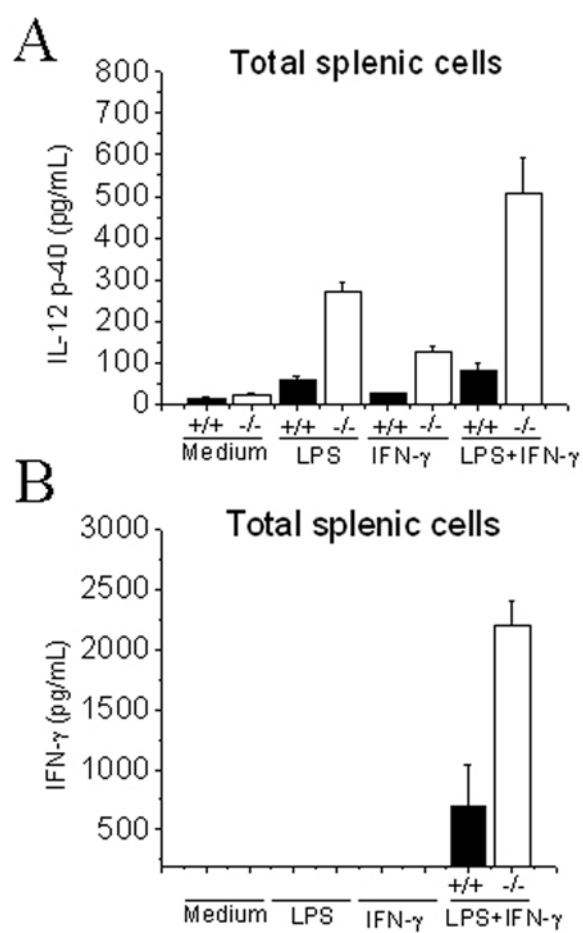












Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)