

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Avaliação do papel da galectina-3 sobre funções
de neutrófilos durante a infecção por cepa
virulenta RH de *Toxoplasma gondii* em
camundongos C57BL/6**

Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Uberlândia

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Celene Maria de Oliveira Simões Alves

**Avaliação do papel da galectina-3 sobre funções de
neutrófilos durante a infecção por cepa virulenta RH de
Toxoplasma gondii em camundongos C57BL/6**

Uberlândia
2009

Celene Maria de Oliveira Simões Alves

**Avaliação do papel da galectina-3 sobre funções de
neutrófilos durante a infecção por cepa virulenta RH de
Toxoplasma gondii em camundongos C57BL/6**

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor.

Área de concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Co-orientadora: Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

Uberlândia

2009

A *Deus*,

pelo dom da vida, pela saúde, por iluminar o meu caminho,
por sempre estar ao meu lado protegendo-me e guiando os meus passos.

Graças, *Senhor*, porque me ofertas, em nome do amor,
coragem, paciência e sabedoria
para que eu caminhe em linha reta e alcance os meus sonhos!

Aos meus pais

Edmundo Simões Alves e Aida M. M. de Oliveira S. Alves,

pelo amor sem limites ...

Pelos exemplos de coragem, perseverança,

honestidade, sabedoria, esperança.

Pela dedicação à nossa família.

Por sempre acreditarem em mim e pelos esforços

constantemente para a realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs

Ana Cláudia e Gizele,

pela amizade que nos une,

pelos sonhos compartilhados,

pela presença fraterna em todos os momentos,

especialmente naqueles mais importantes ...

Ao meu marido *André Luiz,*

pelo carinho e companheirismo,

paciência e compreensão,

por acreditar em mim e nos meus sonhos.

Às minhas filhas *Letícia e Larissa,*

por representarem graças de Deus em minha vida ...

... razão de alegria infinita.

Agradecimentos Especiais

Aos meus tios, *Carlos e Mila*,
e primos *Carla, Camila e Bruno*
por sempre me acolherem com muito carinho,
pelo incentivo e apoio constantes, pela presença em todos
momentos importantes da minha vida.

A minha avó *Celene*,
por suas orações, apoio e cuidado com a nossa família.

Aos meus avós *Maria e João*,
porque mesmo distante sinto o carinho
e a força de vossas orações.

Aos meus “avós” *Maria do Carmo e Américo*,
pelo incentivo, carinho e exemplo de fé e esperança.

Aos meus sogros *Pedro e Biolêta*,
a todas as pessoas que formam a minha família
e aos meus amigos,
pelo apoio e alegria de conviver com vocês.

Ao Prof. Dr. *José Roberto Mineo*,
por me receber como aluna, confiar
em mim e respeitar as minhas
limitações. Pelos exemplos de
seriedade profissional e dedicação ao
ensino e à pesquisa. Obrigada pela
compreensão, pelo apoio e incentivo
inestimáveis em todos os momentos.

À Profa. Dra. *Deise Aparecida de
Oliveira Silva*, com muita admiração
pela sua competência, dedicação aos
alunos e à ciência. Pelos exemplos de
Ser Humano e respeito ao próximo.
Minha gratidão pelas frutíferas
discussões científicas, por acreditar
em mim, me encorajar e me auxiliar
no desenvolvimento deste trabalho.
Obrigada, Deise, por sua preciosa
amizade!

À minha querida Profa. Dra. *Yara Maria Lucisano Valim*, com admiração por sua dedicação ao ensino, à ciência e ao ser humano. Por sua confiança e atenção para com o meu aprendizado. Pelos exemplos de coragem, paciência, perseverança e alegria de viver...

À farmacêutica *Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini*, da FCFRP-USP, minha amiga e companheira de trabalho, por sua disponibilidade e auxílio na realização de várias etapas deste trabalho. Pelo apoio sincero, incentivo e palavras amigas em tantos momentos.

Agradecimentos

A CAPES, FAPEMIG e ao CNPq
pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, onde teve início a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunoquímica, do Depto. de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, onde parte deste trabalho (funções de neutrófilos) foi desenvolvida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas - ICBIM – UFU, pela contribuição para a minha formação acadêmica e científica.

À Profa. Dra. *Eloísa Amália Vieira Ferro*, com admiração por sua dedicação à pesquisa a aos alunos; por seu eficiente trabalho como coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas; por seu incentivo e colaboração em experimentos de microscopia confocal e imunohistoquímica.

Ao Prof. Dr. *Ernesto Akio Taketomi*, por seu apoio e confiança, e pelas oportunidades de aprendizado e colaboração em sua disciplina.

Às Profas. Dras. *Janethe Deolinda de Oliveira Pena* e *Neide Maria da Silva*, pelo apoio e agradável convivência.

Ao Prof. Dr. *Tiago W. P. Mineo*, pelos momentos de valiosas discussões científicas.

Ao Prof. Dr. *Jair Pereira Cunha Júnior* pelo incentivo e agradável convivência.

Aos Profs. Drs. *Adriano Loyola* e *Paulo Rogério Faria*, por nos cederem as primeiras matrizes de animais C57BL/6 selvagens e *knockouts* para galectina-3 no CBEA – UFU e o anticorpo anti-galectina-3.

À *Cristina Rostkowska*, por sua valiosa colaboração na expansão das matrizes de camundongos C57BL/6 selvagens e *knockouts* para galectina-3 e cuidado com os animais. Por sua amizade e exemplo de humildade.

À *Deborah Cristina Rocha Fagundes*, por sua colaboração no cuidado com os camundongos C57BL/6 *knockouts* para galectina-3.

À *Ana Cláudia A. M. Pajuaba*, por sua dedicação ao laboratório e agradável convivência.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia, *Zilda Mendonça Cardoso*, *Marley Dantas Barbosa* e *Max Aor Marques*, pelo suporte técnico e amizade.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, *Luceleide Freitas Queiroz Damásio* e *Lucélia da Costa Assis* pela eficiência, prontidão em nos atender e agradável convivência.

Ao funcionário *Jorge Andrade Rodrigues* do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, por sua atenção e paciência em nos atender.

Aos funcionários do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU, *Antônio Tomás Júnior*, pela prontidão em nos ajudar nas viagens para a USP -Ribeirão Preto; e *Táisa Carrijo de Oliveira*, pela competência no cuidado com os animais.

Aos companheiros de bancada e biotério *Julianne Carvalho*, *Priscilla Buiatti* e *Pablo Gomes Noletto*, pela prontidão em ajudar no cuidado com os animais, e nos experimentos em que noites se fizeram dias de trabalho intenso.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia *Gabriele*, *Anatália*, *Guilherme*, *Hugo*, *Álvaro*, *Hercílio*, *Silas*, *Arlindo*, *Mariana*, *Marina*, *Everton*, pelos momentos de aprendizado compartilhado e incentivo mútuo.

Ao amigo *Dâmaso Pacheco Ribeiro*, pelo exemplo de dedicação ao próximo, pelo apoio e incentivo em momentos difíceis, pela amizade sincera.

Aos amigos do Laboratório de Alergia *Carolina, Rafael, Jorge, Diego, Ronaldo, Priscila, Karine, Juliana, Gesmar*, pela agradável convivência e aprendizado compartilhado.

Ao doutorando *Leandro Hidek Ynoue*, por sua amizade e preciosa ajuda na escrita das referências desta tese.

À farmacêutica *Danielle Reis Napolitano*, grande amiga e companheira de faculdade, pelo apoio, incentivo e amizade inestimáveis.

Às meninas do Laboratório de Histologia, *Bellisa, Angélica, Idessânia, Priscila e Andressa*, pela amizade e troca de conhecimentos e, em especial, *Mariana Bodini* por sua ajuda em experimentos de microscopia confocal e imunohistoquímica.

Aos Profs. Drs. do Laboratório de Bioquímica da FCFRP- USP: *Ana Isabel de Assis Pandochi, Carem Glêdes Vargas Rechia, Carlos Curti, César Augusto C. Spadaro*, pelo apoio, amizade e incentivo constantes.

À minha amiga Profa. Dra. *Clêni Mara Marzocchi Machado*, da FCFRP-USP, por sua amizade e preocupação com o meu aprendizado ao longo da minha formação acadêmica. Pelo exemplo de competência e de ser humano.

À bióloga *Ana Cristina Morselli Polizello*, da FCFRP-USP, por sua amizade preciosa, pelo carinho, apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica da FCFRP - USP, *Ieda Maria Razononi Prado, Maria Regina Pilá Raphaeloski, Nadir Mazzucato e Alcides Silva Pereira*, pela amizade e incentivo ao longo de tantos anos.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Imunoquímica da FCFRP- USP *Ana Paula Landi, Luciana Kabeya, Andréia, Carolina, e Everton* pela agradável convivência e momentos de aprendizado compartilhado.

Ao farmacêutico *Walter Miguel Turato*, da FMRP-USP, pela amizade e pelo precioso auxílio no aprendizado e execução dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. *Sérgio Akira Uyemura*, da FCFRP-USP, pelo incentivo e preciosa amizade.

Ao Prof. Dr. *Auro Nomizo*, da FCFRP-USP, por sua amizade e incentivo.

À todos aqueles, que mesmo não mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Aos animais que participaram deste estudo, com todo o respeito pelo sacrifício de suas vidas a favor da Ciência.

Tudo a seu tempo

“Todas as coisas têm seu tempo, e todas elas passam debaixo do céu ... Há tempo de nascer e de morrer. Há tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou. Há tempo de matar, e tempo de sarar. Há tempo de destruir, e tempo de edificar. Há tempo de chorar, e tempo de rir. Há tempo de se afligir, e tempo de saltar de gosto. Há tempo de espalhar pedras, e tempo de as ajuntar. Há tempo de dar abraços, e tempo de se pôr longe deles. Há tempo de adquirir, e tempo de perder. Há tempo de aguardar, e tempo de lançar fora. Há tempo de rasgar, e tempo de coser. Há tempo de calar, e tempo de falar. Há tempo de amor, e tempo de ódio. Há tempo de guerra, e tempo paz.” Eclesiastes 3, 1-8.

Mas certamente há mais tempo de amor do que tempo de ódio ...

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg ou (R)	Arginina
Asn ou (N)	Asparagina
Asp ou (D)	Aspartato
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CC ou CXC	Quimiocinas
CD	<i>Cluster differentiation</i>
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
Células Th1	Células <i>T helper</i> tipo 1
Com	contagens por minuto
CR1	Receptor para complemento tipo 1
CR3	Receptor para complemento tipo 2
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
DAB	3,3'- tetraidrocloro de diaminobenzidina
DPI	Iodônio difenileno
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal – Related Kinase</i>
Fc γ R	Receptor para a porção Fc (fragmento cristalizável) de imunoglobulina G
fMLP	N - formil – Metionil – Leucil - Fenilalanina
Gal-3	Galectina-3
Gal-3 ^{-/-} ou KO	Camundongo deficiente do gene de galectina-3; <i>knockout</i>
Gal-3 ^{+/+} ou WT	Camundongo selvagem; <i>Wild Type</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>

Gly ou (G)	Glicina
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	Moléculas de Adesão Intracelular
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucinas
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-Activated Kinases</i>
MIP- 1 β	Proteína inflamatória de macrófagos – beta
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos – alfa
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PMA	Forbol – 12- Miristato – 13 - Acetato
PMSF	Fenil – Metilsulfonil - Fluoreto
OS	Fosfatidilserina
QL	Quimioluminescência
QLlum	Quimioluminescência Dependente de Luminol
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Ser ou (S)	Serina
STAg	Antígeno Solúvel de <i>T. gondii</i>

TLRs	Receptores <i>Toll Like</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - alfa
Trp ou (W)	Triptofano
Vol	Volume

RESUMO

Galectinas são lectinas animais ligantes de beta-galactosídeos envolvidas em vários processos biológicos, sendo que galectina-3 (Gal-3) tem sido relacionada à modulação de reações imunes e respostas inflamatórias. O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de Gal-3 na viabilidade de neutrófilos, apoptose precoce e morte celular em paralelo com suas funções biológicas após infecção *in vitro* e *in vivo* por cepa virulenta RH de *Toxoplasma gondii*, utilizando animais C57BL/6 selvagens (Gal-3^{+/+}) e deficientes no gene para galectina-3 (Gal-3^{-/-}). Camundongos Gal-3^{-/-} exibiram diminuído recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal após estímulo com tioglicolato, mas não após infecção com a cepa virulenta RH de *T. gondii*, a qual induziu curvas de sobrevivência e escores de morbidade semelhantes a camundongos Gal-3^{+/+}. Além disto, maior geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por neutrófilos peritoneais inflamatórios foi observada em camundongos Gal-3^{+/+} infectados com esta cepa virulenta e relacionada ao estágio inicial de infecção. A infecção *in vitro* de neutrófilos por *T. gondii* induziu aumento na viabilidade celular e diminuição da exposição de fosfatidiserina (PS) e da morte celular em neutrófilos Gal-3^{+/+}, mas não em neutrófilos Gal-3^{-/-}. Ao contrário, a infecção pelo parasito induziu maior liberação de LDH por neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado a Gal-3^{+/+}. Liberação de lisozima foi maior em neutrófilos Gal-3^{-/-} do que em Gal-3^{+/+}, independente de infecção, mas a infecção por *T. gondii* induziu desgranulação aumentada em neutrófilos Gal-3^{+/+}. A produção de IL-10 e TNF- α foi modulada por Gal-3, mas não pela infecção por *T. gondii*. Ao contrário, maiores níveis de IL-6 foram produzidos por neutrófilos Gal-3^{-/-} infectados por *T. gondii*. Infecção por *T. gondii* ou estimulação com STAg em alta concentração diminuiu a geração de ROS PMA-dependente em neutrófilos Gal-3^{+/+}, mas não alterou a geração de ROS em neutrófilos Gal-3^{-/-}, comparados aos respectivos controles. A geração de ROS zimosan-dependente foi diminuída após infecção por *T. gondii* em neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}. Assim, pode-se concluir que Gal-3: (1) é essencial para aumentar a viabilidade celular por diminuir apoptose precoce e morte celular em neutrófilos induzidas por *T. gondii*; (2) diminui a toxicidade em neutrófilos causada pela infecção por *T. gondii* e diminui a desgranulação independente da infecção; (3) modula a secreção de citocinas pró- e antiinflamatórias por neutrófilos infectados ou não por *T. gondii*; (4) é essencial para diminuída geração de ROS PMA-dependente em neutrófilos

induzida pela infecção por *T. gondii*, mas não para a diminuída geração de ROS zimosan-dependente após infecção. Em conclusão, galectina-3 desempenha um importante papel imunomodulador em neutrófilos sob infecção com a cepa virulenta RH de *T. gondii*, particularmente durante seu estágio inicial, por interferir na viabilidade e ativação de neutrófilos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Neutrófilos. Galectina-3. Apoptose. ROS. Viabilidade Celular.

ABSTRACT

Galectins are beta-galactoside-binding animal lectins involved in several biological processes, and Gal-3 has been related to modulation of immune reactions and inflammatory responses. The present study aimed to evaluate the influence of Gal-3 in neutrophil viability, early apoptosis and cell death in parallel with its biological functions after *in vivo* and *in vitro* infection with *T. gondii* RH virulent strain, by using C57BL/6 wild type (Gal-3^{+/+}) and Gal-3 knockout (Gal-3^{-/-}) mice. Gal-3^{-/-} mice exhibit decreased neutrophil recruitment to peritoneal cavity after thioglycolate stimulus, but not after virulent *T. gondii* RH strain infection, which induced survival curves and morbidity scores similar to Gal-3^{+/+} mice. Also, higher reactive oxygen species (ROS) generation by inflammatory peritoneal neutrophils was observed in Gal-3^{+/+} mice infected with this virulent strain and related to early stage of infection. *T. gondii* infection induced an increase in cell viability and decrease of both phosphatidylserine (PS) exposure and cell death in WT, but not in KO neutrophil. In contrast, parasite infection induced higher LDH release in KO than WT neutrophil. Lysozyme release was higher in KO than WT neutrophil, regardless of infection, but parasite infection induced increased degranulation in WT neutrophil. IL-10 and TNF- α production was modulated by Gal-3, but not by parasite infection. In contrast, higher IL-6 levels were produced by *T. gondii* infected Gal-3^{-/-} neutrophils. *T. gondii* infection or STAg stimulation decreased ROS generation induced by PMA in WT neutrophils, but no change was found in KO neutrophils. Zymosan-dependent ROS generation was decreased after *T. gondii* infection in WT and KO neutrophils. It can be concluded that Gal-3: (1) is essential to increase cell viability by decreasing early apoptosis or cell death in neutrophils induced by *T. gondii*; (2) decreases neutrophil toxicity caused by parasite infection and diminishes degranulation regardless of infection; (3) modulates pro- and anti-inflammatory cytokine secretion by neutrophils infected or not with *T. gondii*; (4) is essential for decreased PMA-dependent ROS generation in neutrophils induced by *T. gondii* infection, but not for decreased zymosan-dependent ROS generation after parasite infection. Therefore, Gal-3 plays an important immunomodulatory role by interfering in neutrophil life span and activation under early infection with virulent *T. gondii* strain.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Neutrophils. Galectin-3. Apoptosis. ROS. Cell viability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	21
1.1.1	Aspectos gerais	21
1.1.2	Diferenças de virulência entre cepas de <i>T. gondii</i>	22
1.1.3	Ciclo biológico	23
1.1.4	Imunidade contra <i>T. gondii</i>	25
1.2	Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos	27
1.2.1	Características gerais	27
1.2.2	Neutrófilos, fagocitose e metabolismo gerador de ROS	29
1.2.3	Neutrófilos, citocinas e quimiocinas	32
1.3	Galectinas e galectina-3	33
1.3.1	Aspectos estruturais e funcionais	33
1.3.2	Galectina-3 e apoptose	36
1.4	Interação entre <i>Toxoplasma gondii</i> , neutrófilos e galectina-3	40
2	OBJETIVOS	47
2.1	Geral	47
2.2	Específicos	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	Animais	49
3.2	Detecção de galectina-3 em lisados de macrófagos peritoneais de camundongos	49
3.2.1	Obtenção de macrófagos peritoneais e lisados celulares	49
3.2.2	<i>Immunoblot</i>	51
3.3	Parasitas	52
3.3.1	Opsonização de taquizoítas de <i>T. gondii</i>	52
3.3.2	Reação de imunofluorescência	53
3.4	Preparação de antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	53
3.4.1	SDS-PAGE e <i>Immunoblot</i>	54
3.5	Modelos de infecção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> por cepa virulenta RH de <i>T. gondii</i>	55
3.6	Infecção de camundongos por <i>T. gondii</i> (cepa RH)	57
3.7	Indução da inflamação peritoneal	57
3.8	Isolamento de neutrófilos peritoneais inflamatórios	59
3.9	Infecção de neutrófilos <i>in vitro</i>	59
3.10	Ensaio de apoptose	60

3.11	Análise da viabilidade celular	61
3.12	Análise da toxicidade celular	61
3.13	Análise de citocinas	62
3.14	Análise da desgranulação de neutrófilos pela dosagem de lisozima	63
3.15	Análise do metabolismo gerador de ROS por quimioluminescência dependente de luminol	64
3.15.1	Geração de ROS <i>in vitro</i>	64
3.15.2	Preparação de zimosan	65
3.15.3	Geração de ROS <i>in vivo</i>	66
3.16	Análise estatística	66
4	RESULTADOS	68
4.1	PARTE I : Padronização das Condições Experimentais	68
4.1.1	Padronização dos estímulos para indução do influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6	68
4.1.2	Avaliação da geração de ROS em neutrófilos peritoneais inflamatórios	70
4.1.2.1	Padronização da concentração de neutrófilos para os ensaios de quimioluminescência dependente de luminol	70
4.1.2.2	Padronização da concentração de PMA para os ensaios de quimioluminescência dependente de luminol	73
4.1.2.3	Padronização da concentração de zimosan para os ensaios de quimioluminescência dependente de luminol	74
4.1.3	Deteção de galectina-3 em lisados de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	76
4.1.4	Reação de imunofluorescência com taquizoítas de <i>T. gondii</i> opsonizados	77
4.1.5	<i>Immunoblot</i> do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	78
4.1.6	Viabilidade celular de neutrófilos estimulados com STAg	79
4.2	PARTE II: Avaliação do Papel da Galectina-3 sobre funções de Neutrófilos durante a infecção por Cepa Virulenta RH de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos C57BL/6	80
4.2.1	Efeito da galectina-3 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos após inflamação induzida por tioglicolato ou <i>T. gondii</i>	80
4.2.2	Papel da galectina-3 na infecção <i>in vivo</i> por cepa virulenta de <i>T. gondii</i>	83
4.2.3	Efeito da galectina-3 sobre a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos infectados com a cepa virulenta RH de <i>T. gondii</i>	85
4.2.4	Efeito da infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> sobre exposição de fosfatidilserina em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	88
4.2.5	Efeito da infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> sobre a viabilidade de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	91

4.2.6	Toxicidade induzida pela infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	93
4.2.7	Efeito da infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> sobre a produção de citocinas por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	95
4.2.8	Efeito da infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> sobre a desgranulação de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	97
4.2.9	Efeito da infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> sobre a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	99
4.2.10	Efeito da infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> sobre a geração de ROS induzida por zimosan em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	101
4.2.11	Efeito da estimulação <i>in vitro</i> por antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> sobre a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3 ^{+/+} e Gal-3 ^{-/-}	103
5	DISCUSSÃO	105
6	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

1.1.1 Aspectos gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório que infecta a maioria das células nucleadas de aves e mamíferos. A primeira descrição deste parasito ocorreu em 1908 por Splendore no Brasil e por Nicolle e Manceaux na África do Norte. A designação desta espécie originou-se do nome do roedor norte africano *Ctenodactylus gondii*, do qual este parasito foi isolado. O nome do gênero é derivado do grego *toxon*, que significa arco, devido ao formato do protozoário (PESSOA; MARTINS, 1988).

De acordo com a classificação de Lineu, a espécie *Toxoplasma gondii* pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e gênero *Toxoplasma* (REY, 2001).

T. gondii apresenta ampla distribuição mundial, sendo uma das infecções parasitárias mais comuns em humanos. Nos Estados Unidos e no Reino Unido estima-se que 9 a 40% das pessoas estejam infectadas (JONES et al., 2007). Na América Central e do Sul calcula-se que a infecção atinja de 50 a 80% das mulheres grávidas (ROSSO et al., 2008). No Brasil, cerca de 70% das gestantes são sorologicamente positivas para *T. gondii* (SPALDING et al., 2005).

T. gondii apresenta três estágios infecciosos: (1) taquizoítas que apresentam rápida proliferação na célula hospedeira, ocorrendo principalmente na fase aguda da doença; (2) bradizoítas que se encontram dentro de cistos teciduais sob replicação lenta (fase crônica) por estresse imposto pela resposta imune do hospedeiro; e (3) esporozoítas liberados a partir de esporocistos contidos em oocistos eliminados nas fezes de felídeos (hospedeiros definitivos), que correspondem às formas infectantes oriundas da reprodução sexuada do parasito que ocorre no intestino de felídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

A infecção pelo parasito pode ocorrer por três rotas: (1) transmissão horizontal por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (esporozoítas) do ambiente; (2) transmissão horizontal por ingestão de carne crua ou mal cozida contendo oocistos teciduais (bradizoítas); (3) transmissão vertical pela passagem transplacentária de taquizoítas de mães infectadas para os fetos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

T. gondii, tipicamente, é um parasito de baixa virulência que causa, na maioria das vezes, infecções assintomáticas em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, a infecção adquire importância em dois grupos de alto risco, mulheres gestantes, podendo causar aborto, mortalidade neonatal e anormalidades fetais, e indivíduos imunocomprometidos, podendo ser observadas grave morbidade e elevada taxa de mortalidade (LUFT; REMINGTON, 1992).

1.1.2 Diferenças de virulência entre cepas de *T. gondii*

As populações de *T. gondii* consistem de três linhagens clonais (tipos I, II e III) com ampla distribuição geográfica. Embora as cepas das três linhagens sejam obtidas de isolados humanos, a maioria dos casos de toxoplasmose humana foi associada com o genótipo tipo II, enquanto em camundongos foi associada com o tipo I (HOWE; SIBLEY, 1995).

Diferentes cepas de *T. gondii* têm sido isoladas e classificadas como virulentas ou avirulentas de acordo com a patogenicidade ao modelo experimental de camundongo. A cepa do genótipo tipo I, a qual pertence à cepa RH, é caracterizada por sua alta virulência em camundongos. Essa linhagem parece estar mais frequentemente associada à toxoplasmose ocular (MAUBON et al., 2008). A linhagem tipo II, a qual pertence à cepa ME-49, é a linhagem encontrada mais comumente em animais e humanos cronicamente infectados na Europa e na América do Norte. Esta linhagem é também encontrada em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e na toxoplasmose congênita (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). A linhagem tipo III (por exemplo, cepas CEP e VEG) está

mais restrita a animais e é menos freqüente que a tipo II na Europa e na África do Norte. Esta linhagem é considerada avirulenta em camundongos, embora cause a morte do animal em algumas semanas ou meses após a infecção, associada com comprometimento neuronal (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005). Por outro lado, o estudo de espécimes obtidos nas Américas Central e do Sul, na África e na Ásia demonstrou que nessas regiões existem linhagens exóticas ou atípicas, que apresentam polimorfismos que não são típicos das linhagens clonais (LEHMANN et al., 2006).

1.1.3 Ciclo biológico

Toxoplasma gondii apresenta um ciclo de vida heteroxeno com uma fase assexuada que ocorre nos hospedeiros definitivos e intermediários, e uma fase sexuada que ocorre apenas em felídeos (hospedeiros definitivos) (Ilustração 1). A infecção pelo parasito ocorre por ingestão de alimentos contaminados com oocistos eliminados com as fezes de felídeos contaminados ou cistos teciduais de animal infectado. Os cistos ou oocistos, sob a ação de enzimas proteolíticas do estômago e intestino delgado, liberam bradizoítas e esporozoítas, respectivamente. Esses parasitos penetram no epitélio do intestino delgado e transformam-se em taquizoítas, que causam infecção aguda sistêmica. Até a fase de invasão das células enteroepiteliais, o processo é comum para todos os hospedeiros (REY, 2001; ALIBERTI, 2005).

Nos felídeos, cinco tipos (I, II, III, IV e V) morfologicamente distintos de *T. gondii* se desenvolvem nas células enteroepiteliais antes de começar a gametogonia. Nesses estágios há replicação do parasito, com formação de merozoítas por esquizogonia. Após esse processo assexuado, desenvolvem-se os macrogametócitos e os microgametócitos que dão origem aos macrogametas (gametas femininos) e microgametas (gametas masculinos), respectivamente. Após a fertilização e formação do zigoto, uma parede é formada ao redor do parasito,

constituindo-se no oocisto não esporulado, que é eliminado com as fezes. A esporulação do oocisto (divisão do núcleo e formação de quatro esporozoítas) ocorre após 1 a 5 dias, dependendo das condições de aeração e temperatura do meio. A infecção pelos esporozoítas completa parte do ciclo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Nos hospedeiros intermediários, além das células do epitélio intestinal, os parasitos invadem células do sistema mononuclear fagocitário, que transportam o parasito para os linfonodos e diferentes órgãos. Nessa fase o parasito, chamado taquizoíta, replica-se rapidamente por endodiogenia (processo semelhante a brotamento interno, com formação de duas células filhas dentro da membrana original do parasito). A velocidade de replicação dos taquizoítas está diretamente relacionada à virulência da cepa do parasito, e também às características da resposta imune do hospedeiro. Quando uma resposta imune específica é desencadeada ocorre o fim da fase aguda. Algumas condições de estresse relacionadas com a produção de interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) restringem a replicação dos parasitos, que se transformam em bradizoítas originando os cistos teciduais. Na fase crônica da infecção, os bradizoítas se multiplicam no interior dos cistos onde ficam isolados dos mecanismos imunes efetores do hospedeiro. Cistos podem ser encontrados em uma variedade de órgãos do hospedeiro, mas predominam no sistema nervoso central e músculos, onde permanecem por toda a vida do hospedeiro. A ingestão desses cistos por outros animais completa o ciclo de vida natural do *T. gondii* (REY, 2001; ALIBERTI, 2005).

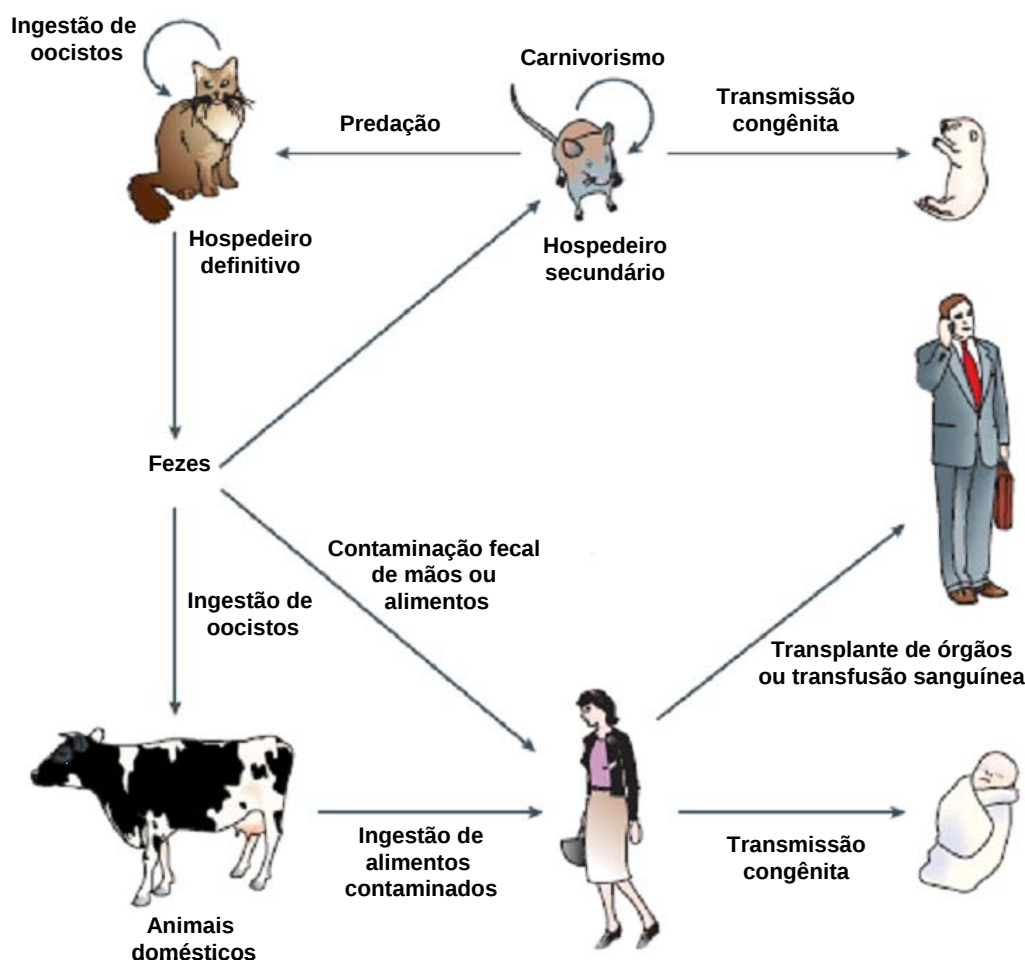


Ilustração 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (ALIBERTI, 2005).

1.1.4 Imunidade contra *T. gondii*

A resposta imune contra *T. gondii* caracteriza-se por ser intensa, persistente e normalmente não lesiva para o hospedeiro, resultando em proteção contra as formas taquizoítas sem provocar alterações imunopatológicas no hospedeiro (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Um dos pontos críticos da resposta imune a *T. gondii* refere-se ao controle da replicação de taquizoítas durante o curso da toxoplasmose.

Inicialmente, a invasão dos parasitos desencadeia a liberação de interleucinas (IL), tais como IL-12 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (GAZZINELLI et al., 1994; BLISS et al., 1999) que são importantes estímulos

para células *natural killer* (NK) produzirem IFN- γ . Essa cascata de citocinas pró-inflamatórias serve a dois propósitos: (1) limitar a replicação do parasito e (2) direcionar a resposta imune para o padrão de células T *helper* tipo 1 (Th1). As citocinas IFN- γ e IL-12 promovem a expansão de células T CD4⁺ que em conjunto com IFN- γ são responsáveis pela produção continuada de anticorpos específicos para *T. gondii* (ARAÚJO, 1992). As células T CD4⁺ produzem IL-2 que promove a expansão das células citotóxicas T CD8⁺. Estas são importantes primariamente para a produção de altos níveis da citocina protetora IFN- γ e, nos estágios tardios da infecção, a atividade citotóxica das células T CD8⁺ é importante na eliminação de células infectadas por parasitos (DENKERS; SHER; GAZZINELLI, 1993). A citocina IFN- γ medeia a morte do parasito com o cofator TNF- α pela ativação de mecanismos microbicidas em macrófagos (DAUBENER et al., 1996). Além disto, o IFN- γ é importante no controle da replicação do parasito pela indução da produção de indoleamina 2,3, desoxigenase (IDO), uma enzima que depleta as reservas de triptofano da célula hospedeira, impedindo o crescimento do parasito (PFEFFERKORN; REBHUN; ECKEL, 1986). Essa replicação reduzida favorece a diferenciação em bradizoítas e previne o recrudesimento da infecção (BOHNE; HEESEMANN; GROSS, 1994). Em contrapartida, os efeitos citotóxicos da produção exacerbada de IFN- γ e TNF- α são controlados por IL-10, citocina produzida em sítios de alta replicação do parasito, tais como fígado e baço. A IL-10 reduz a expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, bem como as atividades microbicidas de células dendríticas, células T CD4⁺, células NK e macrófagos (ALIBERTI, 2005).

Com relação à resposta imune humoral, a infecção por *T. gondii* estimula a produção de imunoglobulinas (Ig) G, M, A e E contra antígenos de membrana, secretados e excretados. Anticorpos específicos, em presença de complemento, promovem a lise de taquizoítas extracelulares, porém, parasitos intracelulares e bradizoítas, no interior de cistos, estão protegidos desse mecanismo efetor. Assim, os anticorpos não determinam o fim da infecção,

mas previnem a disseminação do parasito na infecção crônica (GOYAL; GANGULY; MAHAJAN, 1989). Em indivíduos infectados, anticorpos IgM são detectados nos primeiros 7 dias de infecção, alcançando títulos máximos em poucas semanas e declinando gradualmente em 3 a 6 meses. Anticorpos IgG são detectados com 1 a 2 semanas de infecção, e títulos máximos são atingidos em 6 semanas. A detecção de anticorpos IgG circulantes sugere uma infecção crônica, sendo que os títulos de IgG declinam gradualmente em alguns meses ou anos, enquanto títulos baixos persistem por toda a vida. Anticorpos IgA são produzidos concomitantemente com IgG e têm um papel importante na imunidade de mucosa (CHARDES et al., 1990; OMATA et al., 1997), prevenindo a re-infecção com *T. gondii*.

1.2 Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos

1.2.1 Características gerais

Os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos foram descobertos por Paul Erlich quando as técnicas de fixação e coloração celular facilitaram a identificação do núcleo lobulado e da presença dos grânulos citoplasmáticos (ERLICH, 1880 apud DALE; BOXER; LILES, 2008). A denominação neutrófilo é devido à tonalidade neutra dos seus grânulos nas colorações de Romanowsky (BORREGAARD; COWLAND, 1997).

Os neutrófilos são gerados a partir de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea e representam cerca de 50 a 70% do total de leucócitos no sangue periférico de humanos. Neutrófilos circulantes no sangue periférico, quando não recrutados para sítios de inflamação por quimiocinas e fatores quimiotáticos específicos, possuem um tempo de vida médio muito curto, de 6 a 8 horas, e morrem rapidamente por apoptose (ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS, 2003; LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).

O núcleo dos neutrófilos é polimórfico e, geralmente, consiste de três a cinco lóbulos conectados por filamentos finos de cromatina. O citoplasma caracteriza-se por grande

acúmulo de grânulos, os quais são classificados em primários (ou azurófilos), secundários (ou específicos), terciários (ou de gelatinase) e vesículas secretórias. Estes grânulos distinguem-se entre si pela sua morfogênese e citoquímica, bem como pela composição de suas membranas e conteúdo em moléculas citotóxicas responsáveis pela degradação de patógenos para a defesa do hospedeiro (MCPHAIL et al., 1992; BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007).

Os neutrófilos destacam-se como a primeira linha de defesa do organismo, pois são os primeiros componentes celulares do sistema imune inato que chegam aos sítios de inflamação, onde se encontram os microrganismos invasores. O fenômeno de migração dos neutrófilos, denominado de quimiotaxia, é induzido por quimiocinas, citocinas, metaloproteinases da matriz extracelular, componentes do sistema complemento e produtos dos microrganismos invasores (KOBAYASHI; VOYICH; DELEO, 2003).

O recrutamento dos neutrófilos é caracterizado por interações transitórias entre moléculas de adesão da família das selectinas, presentes no endotélio do vaso sanguíneo e no neutrófilo, seguido de forte adesão ao endotélio vascular mediada por moléculas de alta afinidade de ligação, como as integrinas (CD11/CD18) presentes nos leucócitos, e as moléculas de adesão intracelular (ICAM) expressas pelas células endoteliais. Finalmente, o neutrófilo migra entre as células endoteliais para alcançar o sítio de infecção extravascular, processo conhecido como diapedese mediado por moléculas de adesão endotélio-plaquetário do tipo 1 (PECAM-1) (LIU et al., 2004). Durante este processo de emigração, o estado dos neutrófilos é alterado de células não-primadas (*naive*) para primadas (*primed*) (NIEMINEN; ST-PIERRE; SATO, 1995).

Ao encontrar o patógeno, os neutrófilos tornam-se completamente ativados e atuam na defesa do organismo por meio de mecanismos dependentes de oxigênio, que envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e de mecanismos independentes de oxigênio,

que compreendem a fagocitose, desgranulação e produção de mediadores anti- e pró-inflamatórios (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

A exposição dos neutrófilos a vários estímulos, particulados e solúveis, tais como partículas antigênicas, imunocomplexos, fatores quimiotáticos produzidos durante um processo inflamatório (por exemplo, fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina), ácido araquidônico, e PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) faz com que suas funções efetoras sejam desencadeadas. A estimulação celular ocorre via diferentes receptores de membrana e a ativação específica de um receptor desencadeia uma via de sinalização intracelular distinta, ativando os mecanismos efetores (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008).

1.2.2 Neutrófilos, fagocitose e metabolismo gerador de ROS

Os neutrófilos são considerados fagócitos profissionais porque possuem como principal função a defesa do hospedeiro por meio da ingestão e destruição de partículas ou patógenos invasores, fenômeno conhecido como fagocitose (QUINN; GAUSS, 2004).

A fagocitose pode ser dividida em quatro etapas sucessivas: adesão entre o fagócito e o patógeno, ingestão, desgranulação e destruição do patógeno ingerido. O processo de adesão é facilitado quando os patógenos estão opsonizados por moléculas para as quais o neutrófilo dispõe de receptores específicos. As principais opsoninas conhecidas são moléculas de IgG, fragmentos do componente 3 (C3) do sistema complemento e carboidratos ou lectinas. Os receptores para opsoninas melhor caracterizados são os FcγR [receptores para a porção Fc (fragmento cristalizável) de imunoglobulina G (IgG)] e os receptores para os componentes C3b (CR1) e C3bi (CR3) do sistema complemento. Os neutrófilos também podem interagir diretamente com microrganismos por meio do reconhecimento de determinantes antigênicos expressos na superfície desses alvos (OFEK et al., 1995).

Após a adesão ao patógeno, o neutrófilo projeta pseudópodos e o envolve em um vacúolo fagocítico denominado fagossoma. Os grânulos citoplasmáticos, então, se fundem com o fagossoma e liberam seus produtos, em um processo denominado desgranulação. Simultaneamente a estes eventos ocorre a geração de ROS, com grande potencial microbicida (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

A ativação do processo de fagocitose estimula no neutrófilo um metabolismo gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS), referido na literatura como “burst”, surto ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa, caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e de ATP (trifosfato de adenosina), aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da geração de ROS (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

A geração de ROS em neutrófilos é mediada por um complexo enzimático, associado às membranas citoplasmática e dos grânulos, denominado NADPH-oxidase. Este complexo é constituído por cinco componentes principais: $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ presentes no citoplasma na forma de um complexo, e $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$ ($phox = phagocyte oxidase$), que coexistem em um heterodímero denominado flavocitocromo b_{558} , localizado nas membranas plasmática e de vesículas secretórias e grânulos específicos. A atividade NADPH-oxidase também depende de uma GTPase (Rac 1-2). Após uma perturbação na membrana plasmática durante fagocitose ou interação entre a superfície celular e uma variedade de agentes, ocorre o deslocamento dos componentes citosólicos para a membrana, e a enzima NADPH-oxidase adquire sua forma ativa. O complexo NADPH-oxidase ativo transporta elétrons do NADPH no citoplasma para o O_2 no fluido extracelular ou no espaço intrafagossômico, para formar o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é convertido em H_2O_2 , que, por sua vez, gera outras ROS, por meio de reações químicas e enzimáticas (BABIOR, 2000; KITAGAWA et al., 2003; DECOURSEY; LIGETI, 2005) (Ilustração 2).

Outra enzima importante no metabolismo gerador de ROS em neutrófilos é a MPO (mieloperoxidase), que catalisa a oxidação de íons haleto (Cl^- , Br^- , I^-) para ácidos hipohalosos, utilizando H_2O_2 como substrato (BABIOR, 1999; PULLAR et al., 2000) (Ilustração 2).

Durante a geração de ROS, alguns radicais de oxigênio (oxigênio singlete: $^1\text{O}_2$) possuem elétrons fora do seu estado fundamental e são, portanto, altamente reativos. Quando esses elétrons retornam ao seu estado fundamental, ocorre a liberação de fótons, sendo que esta produção de luz é conhecida como quimioluminescência (QL) e representa uma característica do metabolismo gerador de ROS em neutrófilos (KLEIN, 1990).

As espécies reativas de oxigênio geradas em neutrófilos atuam como oxidantes de vários compostos nos sistemas biológicos (por exemplo, lipídeos de membrana e proteínas) formando uma grande variedade de espécies químicas reativas, as quais são importantes para degradar o patógeno fagocitado. A presença de ROS no espaço extracelular é controlada por moléculas antioxidantes naturais [NADPH, SOD (enzima superóxido dismutase), catalase e glutathione peroxidase], que previnem a formação ou sequestram os radicais livres, interrompendo a cadeia de reações de propagação (Ilustração 2).

Marcadores luminescentes (sondas) são utilizados para amplificar a quantidade de luz emitida durante a geração de ROS. Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox que geram intermediários eletronicamente excitados, os quais ao retornarem ao seu estado basal emitem fótons que podem ser quantificados como QL. A QL é amplamente utilizada como um método para quantificar a geração de ROS por neutrófilos (ALVES et al., 2003).

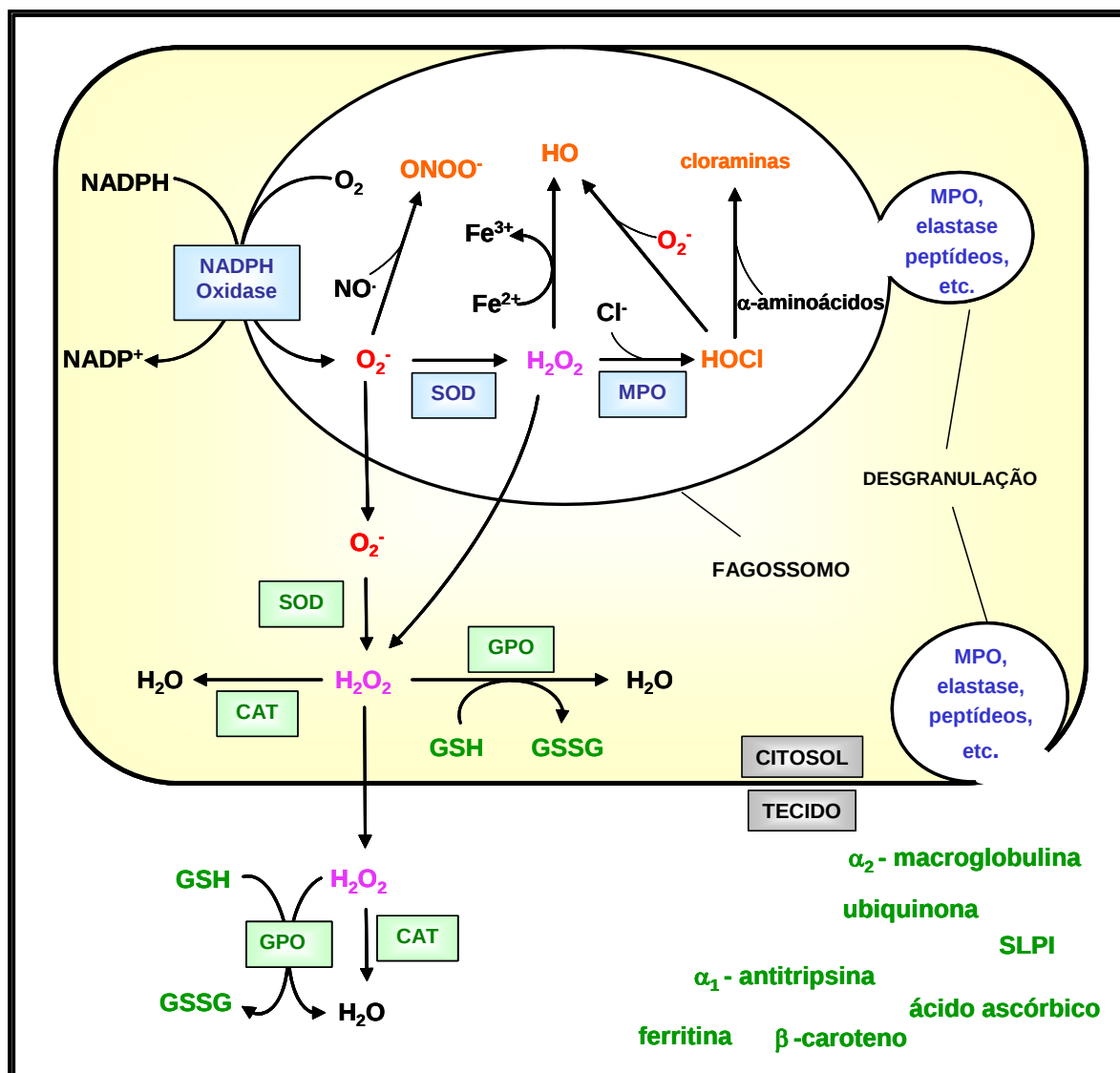


Ilustração 2. Representação simplificada das reações que ocorrem durante o metabolismo gerador de ROS em neutrófilos. (1) O ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é produzido pelo complexo enzimático da NADPH-oxidase. (2) A dismutação do $O_2^{\bullet -}$ pela SOD produz o H_2O_2 . (3) A MPO proveniente dos grânulos citoplasmáticos catalisa a produção de HOCl e outras espécies halogenadas a partir do H_2O_2 . (4) As ROS produzidas nas etapas 1, 2 e 3 são convertidas a outras espécies oxidantes, por meio de diversas reações químicas. (5) As espécies oxidantes e os constituintes dos grânulos que extravasam para o citosol e/ou para o meio extracelular são inativadas pelos componentes do sistema de defesa celular e tecidual (alguns deles estão representados em verde). Esquema adaptado de Klein (1990) e Halliwell (1999). Abreviaturas: CAT: catalase; GPO: glutathione peroxidase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; MPO: mieloperoxidase; SLPI: inibidor de protease secretória de leucócitos; SOD: superóxido dismutase.

1.2.3 Neutrófilos, citocinas e quimiocinas

Além de sua atividade microbicida, os neutrófilos produzem várias citocinas e quimiocinas importantes na coordenação do sistema imune. Estes fagócitos são capazes de

secretar o fator quimiotático para neutrófilos IL-8 e fatores quimiotáticos para macrófagos MIP-1 α e MIP-1 β (proteína inflamatória de macrófagos). As quimiocinas MIP-1 α e MIP-1 β agem como fatores ativadores e quimiotáticos para monócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas imaturas e células T *helper* 1 (GOUWY et al., 2005). Além disto, vários estudos têm mostrado que neutrófilos produzem as citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α durante infecção por *Candida albicans*, estimulação *in vitro* com LPS ou quando estimulados com antígeno de *T. gondii* (HAZIOT et al., 1993; ROMANI et al., 1997; CASSATELLA et al., 1997; BLISS; ZHANG; DENKERS, 1999). Portanto, a produção de mediadores inflamatórios por neutrófilos sugere um importante papel para estes fagócitos no recrutamento de outros tipos celulares para o tecido inflamado, e como fonte de citocinas que influenciam na atividade dessas células.

De maneira geral, o recrutamento dos neutrófilos devido a uma lesão tecidual inicia e amplifica a resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro. O processo de resolução natural da inflamação envolve a remoção do estímulo inicial, decréscimo na produção de mediadores pró-inflamatórios, aumento na produção de mediadores anti-inflamatórios e eliminação (*clearance*) de células inflamatórias e restos celulares (HENSON, 2005; SERHAN; SAVILL, 2005).

1.3 Galectinas e galectina-3

1.3.1 Aspectos estruturais e funcionais

Galectinas são membros de uma família de lectinas animais que apresentam duas características principais: (1) possuem afinidade para resíduos de β -galactosil e (2) seqüências peptídicas conservadas no domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD). A maioria das galectinas são multivalentes, compostas por dois CRDs ou existindo em uma forma dimerizada (BARONDES et al., 1994; CUMMINGS; LIU, 2009).

Em geral, estas lectinas estão envolvidas em vários processos biológicos, incluindo regulação do crescimento celular e apoptose, transformação neoplásica e respostas inflamatórias (RABINOVICH et al., 2002). Um dos membros dessa família é a galectina-3 (CBP30/35, Mac-2, ϵ BP ou L29), proteína solúvel, com aproximadamente 30 kDa. Esta lectina foi primeiramente descrita como expressa na superfície de macrófagos elicitados com tioglicolato (HO; SPRINGER, 1982).

Galectina-3 (Gal-3), diferentemente de outras galectinas, consiste de um monômero com um único CRD (C-terminal, com aproximadamente 130 aminoácidos) associado a um domínio regulatório não-lectínico (N-terminal, com aproximadamente 120 aminoácidos) que contém repetições de uma sequência rica em prolina, glicina e tirosina. Após o reconhecimento de seus ligantes na superfície celular, a conformação da galectina-3 sofre mudanças que resultam em sua oligomerização, por meio de auto-organização do domínio N-terminal dos monômeros. Estudos prévios têm demonstrado que ambos os domínios C-terminal e N-terminal são essenciais para as funções biológicas da galectina-3 (NIEMINEN et al., 2007).

A galectina-3 é encontrada em vários tecidos (epitélios gastrointestinal e respiratório, rins, pulmões, timo, próstata, fígado, alguns neurônios sensoriais) e diferentes tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos e osteoclastos, células de Langerhans, células dendríticas e mielóides, monócitos/macrófagos, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e, sob condições específicas, por exemplo durante infecções, sua expressão pode ser induzida em linfócitos T e B (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; LIU; HSU, 2007). Esta lectina geralmente está localizada no citoplasma, mas dependendo do tipo celular e estado proliferativo, quantidades significantes desta proteína podem ser detectadas no núcleo e na superfície celular. Além disto, galectina-3 também pode ser encontrada na matriz extracelular, sendo que a sua secreção ocorre por uma via incomum independente do retículo

endoplasmático e complexo de Golgi (MOUTSATSOS et al., 1987; FRIGERI; LIU, 1992; SATO; BURDETT; HUGHES, 1993; SATO; HUGHES, 1994).

A galectina-3 também exibe expressão patológica em alguns tumores, por exemplo, em carcinomas humanos de pâncreas, cólon e tireóide (KRZESLAK; LIPINSKA, 2004) e é detectada em fluidos extracelulares sob condições inflamatórias, por exemplo, em lágrimas de pacientes com doenças oculares, líquido sinovial de indivíduos com artrite reumatóide, lavado nasal de indivíduos atópicos e não-atópicos (HRDLICKOVÁ; NEHYBA; BOSE, 2001; OHSHIMA et al., 2003; BRYBORN et al., 2005).

A diversidade na expressão de galectina-3 sugere um papel multifuncional para esta molécula. As atividades biológicas desta proteína no compartimento extracelular envolvem sua ligação a várias glicanas contendo β -galactosídeos. Galectina-3 liga-se a proteínas da matriz extracelular, tais como laminina, fibronectina e elastina de maneira carboidrato-dependente e modula a adesão celular à matriz extracelular (LIU; RABINOVICH, 2005). Por exemplo, galectina-3 recombinante promove a adesão de neutrófilos humanos à laminina e células endoteliais (KUWABARA; LIU, 1996; SATO et al., 2002). Além disto, galectina-3 extracelular atua como um estímulo quimioatraente para monócitos e macrófagos (SANO et al., 2000).

Na superfície celular, galectina-3 interage com vários ligantes e os eventos fisiológicos subsequentes constituem alvos em potencial para estudos. Dados da literatura têm mostrado que a ligação de galectina-3 a CD98 em células *Jurkat* (linfócitos T) induz a captação de cálcio extracelular (DONG; HUGHES, 1996); a interação entre galectina-3 e receptores para IgE em mastócitos desencadeia a desgranulação e liberação de serotonina; e em neutrófilos humanos primados com citocalasina D, fMLP ou lipopolissacarídeo (LPS), a galectina-3 liga-se a CD66a e CD66b, bem como a NCA-160 (CD66) e induz a ativação de NADPH oxidase e o *burst* oxidativo (YAMAOKA et al., 1995; KARLSSON et al., 1998; FEUK-LAGERSTEDT

et al., 1999; ALMIKVIST et al., 2001). Além disto, galectina-3 induz a exposição de selectina-L e produção de IL-8 por neutrófilos humanos *naive* ou primados com citocalasina B e, também, promove a atividade fagocítica deste tipo celular (NIEMINEN; ST-PIERRE; SATO, 2005; FERNÁNDEZ et al., 2005). A função de galectina-3 na fagocitose também tem sido demonstrada comparando macrófagos de camundongos deficientes de galectina-3 (Gal-3^{-/-}) e selvagens (Gal-3^{+/+}), com macrófagos Gal-3^{-/-} exibindo reduzida fagocitose de eritrócitos opsonizados e timócitos apoptóticos (SANO et al., 2003).

1.3.2 Galectina-3 e apoptose

Apoptose ou morte celular programada é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas na arquitetura celular que contribuem para a morte da célula, bem como a preparam para o *clearance* por fagócitos e impedem respostas imunes inapropriadas. Os estímulos que desencadeiam apoptose em uma célula parecem estar associados a eventos que culminam com a ativação de uma família de cisteína – proteases denominadas caspases (TAYLOR et al., 2008).

As principais vias de ativação de apoptose mediada por caspases ativadas estão apresentadas na ilustração 3. A via extrínseca de ativação de caspases envolve a interação de ligantes extracelulares (FasL ou TNF- α) com receptores transmembrana de morte. Esta interação causa o recrutamento da proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*), a qual recruta e agrega várias moléculas de caspase-8 promovendo sua ativação. Caspase-8 ativada processa proteoliticamente e ativa as caspases -3 e -7, levando a eventos subsequentes de ativação de caspases que culminam em proteólise de substratos e morte celular. Em algumas situações, sinais extrínsecos de morte podem cruzar com a via intrínseca através da proteólise da proteína BID (*BH3-interacting domain death agonist*) em tBID, mediada por caspase-8. A proteína tBID pode promover a liberação mitocondrial de

citocromo c e formação do apoptosoma [compreendendo moléculas de APAF-1 (fator -1-ativador de protease apoptótica) e de caspase-9]. Na via intrínseca, diversos estímulos que provocam estresse ou dano celular ativam um ou mais membros da família de proteínas BH3-*only*. Essas proteínas ativadas sobrepõem-se aos efeitos anti-apoptóticos dos membros da subfamília de proteínas Bcl-2 e promovem a reunião dos oligômeros BAK-BAX nas membranas externas mitocondriais. Estes oligômeros permitem o efluxo do citocromo c para o citosol. Uma vez liberado a partir da mitocôndria, o citocromo c agrega-se ao apoptosoma e atua como cofator na ativação da caspase-9 e, portanto, propaga a cascata proteolítica de eventos de ativação de caspases. A via dependente de granzima-B envolve a liberação desta protease nas células – alvo a partir de grânulos especializados liberados por linfócitos T citotóxicos ou células NK. Granzima B cliva seus substratos em resíduos de Asp e pode processar BID, bem como caspases -3 e -7 para iniciar a apoptose (TAYLOR et al., 2008).

Atividades anti- e pró-apoptóticas de galectina-3 têm sido observadas e descritas na literatura. Em geral, galectina-3 intracelular atua como um fator anti-apoptótico, enquanto galectina-3 extracelular atua principalmente como um fator pró-apoptótico. Está bem estabelecido que a galectina-3 intracelular protege diferentes tipos de células contra a apoptose induzida por vários estímulos. Por exemplo, células T infectadas com o vírus tipo I de leucemia de células-T expressando galectina-3 foram mais resistentes à apoptose estimulada com o anticorpo anti-Fas ou estaurosporina (inibidor de proteína quinase), comparado a células-não infectadas (YANG; HSU; LIU, 1996). A atividade anti-apoptótica de galectina-3 também tem sido confirmada em outros tipos celulares. A expressão de galectina-3 em células BT549 de carcinoma humano de mama inibe a apoptose induzida por óxido nítrico (MOON et al., 2001). Entretanto, os mecanismos precisos para esta ação anti-apoptótica de galectina-3 não estão bem elucidados.

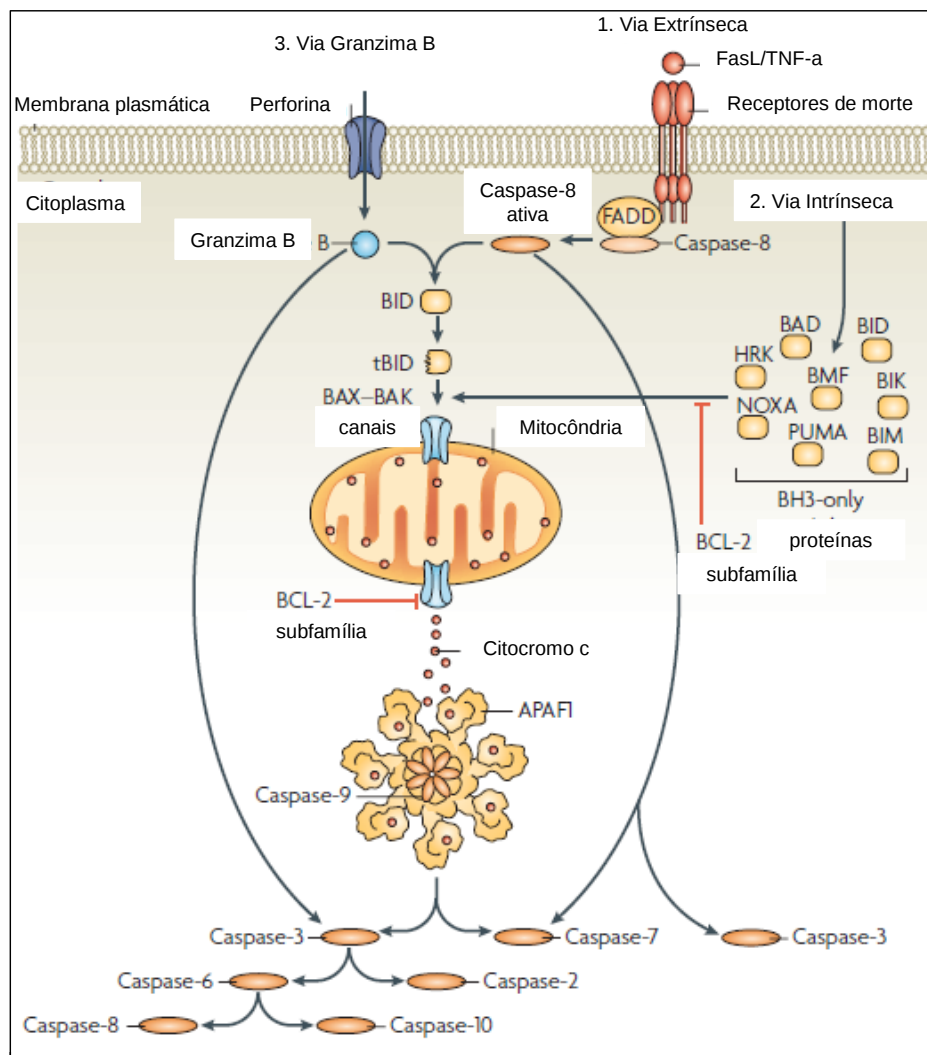


Ilustração 3. Vias de ativação de caspases. A via extrínseca (1) envolve a interação de ligantes extracelulares (FasL ou TNF- α) com receptores transmembrana de morte causando o recrutamento da proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*), a qual ativa caspase-8 levando a eventos subsequentes de ativação de caspases e morte celular. Na via intrínseca (2), estímulos que provocam estresse ou dano celular ativam um ou mais membros da família de proteínas pró-apoptóticas BH3-only levando à reunião dos oligômeros BAK-BAX nas membranas externas mitocondriais e subsequente efluxo do citocromo c para o citosol e subsequente ativação da caspase-9 e propagação da cascata proteolítica de ativação de caspases. A via dependente de granzima-B (3) envolve a liberação desta protease, a partir de linfócitos T citotóxicos ou células NK, nas células – alvo e ativação da proteína BID, bem como de caspases para iniciar a apoptose (TAYLOR et al., 2008).

Galectina-3 não é um membro da família do gene *Bcl-2*, entretanto, compartilha várias propriedades estruturais com a proteína *Bcl-2*. Ambas, galectina-3 e *Bcl-2*, são ricas em aminoácidos prolina, glicina e alanina no domínio N-terminal e contêm a sequência Asn-Trp-Gly-Arg (NWGR) no domínio C-terminal. Esta sequência, denominada como *motif* anti-morte, é encontrada no domínio BH-1 de *Bcl-2* e está associada com a função anti-apoptótica desta proteína (HANADA et al., 1995). A *Bcl-2* é uma proteína mitocondrial que regula a apoptose bloqueando a liberação do citocromo c a partir da mitocôndria (Ilustração 3). De maneira semelhante, foi demonstrado que galectina-3 inibe a liberação de citocromo c e posterior ativação da via das caspases, em células BT549 expostas ao óxido nítrico (MOON et al., 2001). Assim, o *motif* NWGR parece ser essencial para a atividade anti-apoptótica de galectina-3. Além disto, galectina-3 parece ser um regulador apoptótico associado a mitocôndria, adicionalmente a *Bcl2*. No entanto, esta função depende da translocação de galectina-3 a partir do citoplasma ou núcleo para a mitocôndria, a qual é mediada por sinexina, uma proteína da família das anexinas ligante de Ca^{+2} e fosfolípidos de membrana (YU et al., 2002). A fosforilação de galectina-3 no resíduo Ser-6 reduz a afinidade de sua ligação aos ligantes e também está associada à atividade anti-apoptótica desta lectina (YOSHII et al., 2002; TAKENAKA et al., 2004). Além disto, estudos têm sugerido que o efeito anti-apoptótico da galectina-3 é mediado pela ativação das vias de sinalização ERK e JNK (TAKENAKA et al., 2004; SAEGUSA et al., 2008).

De acordo com o exposto anteriormente, parece provável que a galectina-3 modula a sobrevivência celular atuando intracelularmente sobre as vias de sinalização para a morte celular programada. Entretanto, mecanismos extracelulares também devem contribuir para esta função. Por exemplo, a expressão de galectina-3 assegurando maior adesão celular à proteínas da matriz extracelular protege as células da apoptose (MATARRESE et al., 2000). Além disto, foi observado que a adição de galectina-3 exógena a fibroblastos estimula a

proliferação celular, a qual é inibida em presença de lactose, um inibidor da atividade lectínica desta proteína. Portanto, isto sugere que a interação entre galectina-3 e glicoconjugados na superfície celular também pode proteger algumas células de estímulos apoptóticos (NAKAHARA et al., 2005).

Por outro lado, atividade pró-apoptótica de galectina-3 extracelular foi observada em vários tipos de células, incluindo células T leucêmicas humanas, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células T ativadas de camundongos. Interessantemente, foi demonstrado que células T expressando galectina-3 foram menos susceptíveis à apoptose induzida por galectina-3 exógena, comparadas a células T deficientes em galectina-3 (FUKUMORI et al., 2003). Estas diferenças podem ser consequência da atividade anti-apoptótica de galectina-3 intracelular oposta à atividade pró-apoptótica de galectina-3 extracelular. As glicoproteínas de superfície celular CD29 e CD7 foram identificadas como receptores para galectina-3 relacionados a sinalização intracelular apoptótica dependente de mitocôndria e ativação de caspase-3 (DUMIC et al., 2006). Em células T, galectina-3 também pode influenciar a função do receptor CD95, o qual é um dos membros da família de receptores de morte em células T. A via de sinalização desencadeada pela ativação de CD95 é caracterizada por uma ativação sequencial de caspases (FUKUMORI et al., 2004).

Considerando os dados da literatura apresentados, as propriedades funcionais da galectina-3 refletem a importância desta lectina na regulação da resposta imune e inflamação.

1.4 Interação entre *Toxoplasma gondii*, neutrófilos e galectina-3

O sistema imune é um sistema não-linear complexo que envolve a coordenação de vários tipos celulares e um estado de doença frequentemente resulta de uma resposta imune inadequada. A neutropenia é um fator de risco associado com *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*,

Strongyloides ratti e *Toxoplasma gondii* (BARTENEVA et al., 1996; CONLAN, 1997; MENCACCI et al., 1998; PEDROSA et al., 2000; BLISS; ZHANG; DENKERS, 1999; BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000).

Como descrito anteriormente, os neutrófilos são as primeiras células que chegam a um sítio de inflamação ou lesão tecidual. Desta maneira, além de outros mecanismos efetores, estas células secretam numerosas substâncias quimioatraentes que recrutam outros subtipos de leucócitos para o tecido inflamado, a fim de elaborar uma resposta imune harmoniosa e eficiente na defesa do hospedeiro (VAN GISBERGEN et al., 2005).

Toxoplasma gondii é um agente infeccioso eficiente em provocar uma potente resposta imune inata inflamatória. A imunidade inata a *T. gondii* é sustentada por um delicado balanço entre o parasito e seu hospedeiro, envolvendo interações celulares entre enterócitos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, células NK, receptores *Toll-like*, ativação de vias de sinalização, produção de citocinas e ativação de mecanismos efetores antimicrobianos incluindo a geração de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (MILLER et al., 2009).

Estudos realizados para avaliar se a resistência a *T. gondii* em camundongos era dependente de um mecanismo envolvendo neutrófilos, mostraram que camundongos C57BL/6 depletados de neutrófilos e infectados com *T. gondii* sucumbiam durante a fase aguda da doença, mostrando diminuição significativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico, lesões em múltiplos órgãos, produção inadequada de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (citocinas de resposta imune tipo I – Th1), populações esplênicas de células T e NK diminuídas e elevada carga parasitária (SAYLES; JOHNSON, 1996; BLISS et al., 2001). Entretanto, estes efeitos não eram observados quando neutrófilos eram depletados nos estágios tardios da infecção. Assim, estes dados já refletiam a importância dos neutrófilos como células imunomoduladoras na fase aguda da infecção por *T. gondii*.

A exemplo de outros patógenos intracelulares, dados da literatura também

demonstraram que *T. gondii* induzia uma forte resposta imune mediada por células direcionada por IL-12 (ALEXANDER; HUNTER, 1998; DENKERS; GAZZINELLI, 1998). A fonte desta citocina durante infecção por *T. gondii* foi inicialmente atribuída a macrófagos e células dendríticas (GAZZINELLI et al., 1993; REIS et al., 1997). Posteriormente, foi observado que neutrófilos humanos e murinos produziam IL-12 e TNF- α , independentemente de IFN- γ , bem como, MIP-1 α e MIP-1 β , sob estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii* (BLISS et al., 1999; BLISS; ZHANG; DENKERS, 1999). Por outro lado, estudos subsequentes, demonstraram que a infecção por *T. gondii* em camundongos recrutava neutrófilos para o sítio de infecção, uma resposta dependente dos receptores CXCR2 e CXCR1 (receptores de alta afinidade para IL-8), e que os neutrófilos constituíam a principal fonte de IL-12 nesse modelo de infecção (BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000; DEL RIO et al., 2001; KHAN et al., 2001; SUKHUMAVASI; EGAN; DENKERS, 2007). Em conjunto, estes dados sugeriam que neutrófilos deveriam ser células imunoreguladoras importantes durante a resposta imune a *T. gondii* por meio da produção de citocinas e quimiocinas que promovem o desenvolvimento de linfócitos T do tipo Th1.

Entretanto, não estava bem elucidado como neutrófilos poderiam influenciar na diferenciação de células T, a qual é convencionalmente direcionada por células dendríticas nos órgãos linfóides secundários. Neste sentido, foi demonstrado que neutrófilos estimulados com *T. gondii* liberam CCL3, CCL4, CCL5 e CCL20 (MIP-3 α), quimiocinas estas que exibem potente atividade quimiotática para células dendríticas imaturas da medula óssea. Além disto, neutrófilos também liberam fatores solúveis (IL-12 (p40) e TNF- α) que ativam as células dendríticas e aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras, tais como CD40 e CD86. Desta maneira, estes achados sugeriram um modelo no qual neutrófilos recrutam e ativam células dendríticas e proporcionam, conseqüentemente, a diferenciação e ativação de células Th1, e, por fim, imunidade à infecção microbiana (BENNOUNA et al., 2003).

Para confirmar o papel de neutrófilos como células imunomoduladoras em resposta a antígenos microbianos, estudos posteriores demonstraram que neutrófilos estimulados com LPS são capazes de ativar células dendríticas por meio da liberação de citocinas e interações diretas célula-célula (BENNOUNA; DENKERS, 2005). Portanto, durante a infecção por *T. gondii*, os neutrófilos coordenam inicialmente a resposta imune do hospedeiro, por meio da produção de fatores ativadores de células dendríticas e de interações neutrófilo-célula dendrítica. Assim, neutrófilos produzem TNF- α e induzem a produção desta citocina e de IL-12 por células dendríticas, sendo que a produção de TNF- α por células dendríticas é dependente do contato célula-célula e de TNF- α produzido pelos neutrófilos (VAN GISBERGEN et al., 2005; SUKHUMAVASI et al., 2007).

Outra evidência para a importância dos neutrófilos na resistência a *T. gondii* está associada à citocina IL-17, a qual é a principal citocina responsável pelo desenvolvimento e recrutamento de neutrófilos (MILLER et al., 2009). Foi demonstrado que camundongos deficientes no gene para IL-17 apresentam um reduzido recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal após infecção por *T. gondii*, em paralelo a uma carga parasitária cem vezes maior no baço, fígado, intestino e cérebro, comparado aos camundongos selvagens. Portanto, durante a infecção por *T. gondii* o influxo inicial de neutrófilos é dependente da sinalização de IL-17, e os neutrófilos eliminam uma grande proporção dos parasitos durante os estágios iniciais da infecção (KELLY et al., 2005).

A despeito da relevância funcional dos neutrófilos e outros componentes do sistema imune na defesa do organismo hospedeiro contra a infecção por *T. gondii*, este parasito, a exemplo de outros microrganismos, desenvolveu estratégias de evasão imune ou imunomodulação que permitem a sobrevivência de ambos o parasito e o hospedeiro e também garantem um ambiente seguro para a replicação do parasito e sua manutenção na ausência de patologia severa (MILLER et al., 2009).

Um dos mecanismos que permitem ao *T. gondii* evadir da resposta imune inata e que está sendo alvo de várias pesquisas é a inibição da apoptose da célula hospedeira por este parasito (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008). Vários autores demonstraram que células infectadas por *T. gondii* são resistentes a numerosos estímulos apoptóticos (NASH et al., 1998; GOEBEL; GROSS; LÜDER, 2001; PAYNE; MOLESTINA; SINAI, 2003). De maneira geral, a questão intrigante é: por que *T. gondii* retardaria a apoptose da célula hospedeira, se a lise e morte desta célula poderia livrá-lo de seus mecanismos microbicidas? Entre as possíveis respostas está a possibilidade de que a manipulação da apoptose afetaria a progressão da resposta imune *in vivo* (DENKERS; KIM; BUTCHER, 2003). Por exemplo, células apoptóticas, *in vivo*, são rapidamente fagocitadas por macrófagos após exibirem sinais específicos, tal como a exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície celular (LAWEN et al., 2003). Entretanto, ao inibir a apoptose da célula infectada, *T. gondii* pode impedir o *clearance* desta por macrófagos ativados (SINAI et al., 2004).

Neste contexto, atualmente, os mecanismos anti- ou pró-apoptóticos associados com a infecção por *T. gondii* permanecem controversos (SIM et al., 2007; LÜDDER et al., 2009). Vários estudos têm relacionado a produção de mediadores pró-inflamatórios com apoptose durante infecção por *T. gondii*. Por exemplo, foi demonstrado que IFN- γ induz apoptose em células T das placas de Peyer e tecido ocular de camundongos infectados com *T. gondii* (LIESENFELD; KOSEK; SUZUKI, 1997; HU et al., 1999). Óxido nítrico também tem sido sugerido como indutor de apoptose durante infecção por *T. gondii* (GAVRILESCU; DENKERS, 2003). Por outro lado, também foi observado que a infecção por *T. gondii* inibiu apoptose induzida por actinomicina D por meio da inativação de caspases e ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) em células do baço de camundongos (KIM et al., 2006). Além disto, foi demonstrado inibição de apoptose em neutrófilos cultivados com taquizoítas de *T. gondii* derivados de fibroblastos (CHANNON et al., 2002).

Considerando os dados da literatura apresentados sobre galectina-3, esta lectina pode ser caracterizada como um importante mediador pró-inflamatório durante o desenvolvimento de uma resposta imune. Por outro lado, galectina-3 também pode contribuir para a persistência de uma inflamação devido atuar como um fator anti-apoptótico promovendo a sobrevivência de células inflamatórias. Além disso, crescente importância para galectina-3 na resposta inflamatória emerge da propriedade desta lectina em reconhecer glicoconjugados contendo galactosídeos em patógenos (MANDRELL et al., 1994). Neste sentido, foi demonstrado que galectina-3 pode ligar a LPS de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* através de dois sítios independentes, um deles seria o domínio de reconhecimento de carboidrato e o outro seria o domínio N-terminal não-lectínico (MEY et al., 1996). Posteriormente, galectina-3 foi encontrada em células epiteliais da córnea humana e foi demonstrado que a interação entre galectina-3 e o LPS de *Pseudomonas aeruginosa* é um dos fatores responsáveis pela fixação desta bactéria nesse tecido (GUPTA et al., 1997). Também, foi demonstrado que galectina interage com glicolipídeos de *Mycobacterium tuberculosis*, poligalactosídeos em *Leishmania major* e glicanas em ovos de *Shistosoma mansoni* (BEATTY et al., 2002; PELLETIER; SATO, 2002; VAN DEN BERG et al., 2004).

Entretanto, o papel da galectina-3 na infecção por *T. gondii* é pouco descrito na literatura. Estudos *in vivo* com camundongos Gal-3^{-/-} infectados com *T. gondii* mostraram que na ausência desta lectina os animais exibiram escores inflamatórios menores no intestino, fígado e cérebro e maiores nos pulmões, comparado aos animais selvagens (Gal-3^{+/+}) (BERNARDES et al., 2006).

Até o presente momento, interações entre *T. gondii*, neutrófilos e galectina-3 não foram encontradas na literatura. Portanto, baseando-se nas informações apresentadas acima, os neutrófilos destacam-se como células que possuem relevante papel na ativação inicial da resposta imune do hospedeiro contra *T. gondii*, e galectina-3 pode ser uma molécula

importante na modulação das funções efetoras destes leucócitos durante esse processo inflamatório / infeccioso. Desta maneira, investigar a interação entre neutrófilos, galectina-3 e *T. gondii* permitirá estabelecer os seus graus de relevância no contexto da indução de uma imunidade protetora ou do desenvolvimento de processos imunopatogênicos resultantes da infecção parasitária.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o papel da galectina-3 sobre funções de neutrófilos durante a infecção por *T. gondii* em camundongos C57BL/6.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar a cinética do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após inflamação peritoneal induzida por tioglicolato ou *T. gondii*.
- b) Avaliar a susceptibilidade de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após infecção *in vivo* pela cepa virulenta RH de *T. gondii*.
- c) Analisar o metabolismo gerador de ROS induzido por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após infecção *in vivo* com a cepa virulenta RH de *T. gondii*.
- d) Analisar o efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre exposição de fosfatidilserina, viabilidade e morte celular em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}.
- e) Analisar o efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre a toxicidade celular (LDH), desgranulação (lisozima) e produção de citocinas por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}.
- f) Analisar o metabolismo gerador de ROS induzido por PMA ou zimosan em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após infecção *in vitro* com a cepa virulenta RH de *T. gondii*.

- g) Analisar o efeito da estimulação *in vitro* por antígeno solúvel de *T. gondii* sobre a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss para manutenção e obtenção de taquizoítas da cepa virulenta RH de *Toxoplasma gondii*. Também utilizaram-se camundongos C57BL/6 selvagens (Gal-3^{+/+} ou WT) ou geneticamente deficientes do gene da galectina-3 (Gal-3^{-/-} ou KO), com 6 a 8 semanas. Camundongos Gal-3^{-/-} foram gerados no laboratório do Dr. Fu-Tong Liu (University of Califórnia, Davis, EUA) e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira (Laboratório de Glicobiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Todos os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada (25 ± 2 °C) e ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996; MINEO et al., 2005).

3.2 Detecção de galectina-3 em lisados de macrófagos peritoneais de camundongos

3.2.1 Obtenção de macrófagos peritoneais e lisados celulares

Camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (três animais por grupo) foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 1 mL de tioglicolato 3%. Após 72 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 4 mL de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2) para a obtenção de células peritoneais. As células coletadas foram centrifugadas (405 x *g*, 10 minutos, 4 °C) e o sedimento foi lavado duas vezes com meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra)

suplementado com 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA). Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em meio completo, consistindo de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). Uma alíquota desta suspensão de células foi misturada (vol/vol), com o corante de exclusão vital azul de Tripán 0,4% em PBS para contagem de células viáveis em câmara hemocitométrica de Neubauer.

A suspensão celular (3×10^5 células/3 mL/poço) foi adicionada, em triplicata, em placas de cultura de 6 poços (Corning Incorporated Costar®, New York, EUA), em meio completo. Paralelamente, linhagem de células HeLa (American Type Culture Collection, Manassas, EUA) também foram cultivadas nas mesmas condições. Após 2 horas de incubação a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, células não-aderentes foram removidas e células aderentes foram adicionadas de meio completo. Após 24 horas de incubação, monocamadas celulares foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, a obtenção dos lisados celulares foi realizada como descrito anteriormente (LIU et al., 1995). Em resumo, as células foram incubadas com 1 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 0,15 M, Triton X-100 1%) contendo inibidores de proteases (fenil-metilsulfonil-fluoreto [PMSF] 0,5 mM, leupeptina 1 µg/mL e benzamidina 0,5 mM) por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação rápida. Os lisados celulares foram centrifugados a 15.600 x *g* a 4 °C por 30 minutos e os sobrenadantes, livres de debris celulares, foram estocados a – 70 °C até a sua utilização. No momento de uso, a concentração protéica nos lisados celulares foi determinada (BRADFORD, 1976).

O tioglicolato (Difco™ fluid tioglycollate medium) 3% foi preparado misturando-se o tioglicolato com água deionizada previamente aquecida (50 °C). Em seguida, a suspensão foi fervida até a completa solubilização e autoclavada a 120 °C durante 20 minutos.

3.2.2 Immunoblot

Para detecção de Gal-3 por *immunoblot*, amostras dos lisados celulares (13 µg de proteína total) foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, dodecil sulfato de sódio [SDS] 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%) e incubadas por 5 minutos a 100 °C para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% sob condições não-redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). Um volume de 15 µL (13 µg de proteína) de cada amostra foi aplicado em paralelo aos padrões de pesos moleculares (Sigma Marker, Sigma Chemical Co.).

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm, Millipore, Bedford, EUA) utilizando sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia) por 2 horas (TOWBIN; STAEHLIN; GORDON, 1979). O sucesso da transferência foi confirmado por visualização das frações do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose por meio de coloração com solução de Ponceau 0,5%.

As membranas foram cortadas em tiras de 2,5 cm de largura e bloqueadas com PBS-Tween 0,05% (PBS-T) contendo leite desnatado (PBS-TM) 5% por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com IgG de camundongo anti-galectina-3 humana (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) ou IgG de camundongo irrelevante diluídos 1:100 em PBS-TM 1% ou com diluente (controle) por 18 horas a 4 °C sob agitação lenta. Após seis ciclos de lavagens durante cinco minutos com PBS-T, as tiras foram incubadas com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com biotina (Sigma Chemical Co.) diluído 1:250 em PBS-TM 1% por 2 horas à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, as tiras foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (kit ABC, DAKO Co., Carpinteria, EUA) diluído 1:500 em PBS-TM 1% por 1

hora à temperatura ambiente. Novamente, as tiras foram lavadas e, então, reveladas pela adição do substrato enzimático que consistiu de H_2O_2 0,03% e 1 mg/mL de 3,3'- tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical Co.) em salina tamponada com Tris-HCl 0,02 M (TBS) pH 7,4. As massas moleculares aparentes das bandas antigênicas foram estimadas a partir dos cálculos da mobilidade relativa (R_f), segundo a curva do padrão de peso molecular de referência.

3.3 Parasitos

Taquizoítas da cepa virulenta RH de *Toxoplasma gondii* foram mantidos por passagens seriadas em camundongos Swiss, em intervalos de 48 a 72 horas (MINEO et al., 1980). Exsudatos peritoneais foram colhidos em PBS estéril, após leve massagem peritoneal e observados ao microscópio óptico para a triagem dos exsudatos contendo menor grau de contaminação com bactérias, eritrócitos ou outros tipos celulares. Os exsudatos peritoneais selecionados foram lavados duas vezes (720 x *g*, 10 minutos, 4 °C) em PBS e os parasitos foram ressuspensos em meio RPMI. Aliquotas de suspensões de parasitos foram misturadas (vol/vol), com o corante de exclusão vital azul de Tripan 0,4% em PBS e os parasitos viáveis foram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer. O número de taquizoítas por mililitro foi ajustado para a concentração final necessária a cada experimento *in vivo* e *in vitro*.

3.3.1 Opsonização de taquizoítas de *T. gondii*

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* recentemente obtidos de exsudatos peritoneais de camundongos Swiss infectados como descrito no item 3.3, foram incubados a 56 °C por 30 minutos sob agitação suave para inativação pelo calor. Para a opsonização, os parasitos (5×10^6 taquizoítas/mL) inativados foram misturados (vol/vol) com IgG de camundongo anti-*T.*

gondii ou IgG de camundongo irrelevante, diluídos em meio RPMI nas seguintes concentrações: 50, 100, 200 e 400 µg/mL; estas misturas foram mantidas a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, as misturas de taquizoítas e anticorpos foram centrifugadas a 720 x *g*, 10 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes contendo os anticorpos não ligados foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos em meio RPMI (BUTCHER; DENKERS, 2002). Aliquotas foram colocadas sobre lâminas para reação de imunofluorescência e mantidas à temperatura ambiente por 12 horas.

3.3.2 Reação de imunofluorescência

A reação de imunofluorescência foi realizada para verificar a concentração de anticorpo IgG anti- *T. gondii* necessária para a opsonização sem que ocorra aglutinação dos parasitos. Lâminas contendo taquizoítas de *T. gondii* inativados e opsonizados com IgG anti-*T. gondii* ou IgG irrelevante (25, 50, 100 e 200 µg/mL) foram incubadas com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma Chemical Co) na diluição 1:50 em PBS contendo azul de Evans 0,01%. Após incubação por 45 minutos a 37 °C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos com PBS e secas à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 8,5) e examinadas em microscópio epifluorescente (Olympus Mod. BH2, Tokyo, Japão).

3.4 Preparação de antígeno solúvel de *T. gondii*

Antígeno solúvel total ou lisado de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito anteriormente (SILVA et al., 2007), com algumas modificações. Taquizoítas de *T. gondii* obtidos de exsudatos peritoneais de camundongos Swiss infectados foram lavados duas vezes (720 x *g*, 10 minutos, 4 °C) com PBS, contados e ajustados para aproximadamente 1×10^8

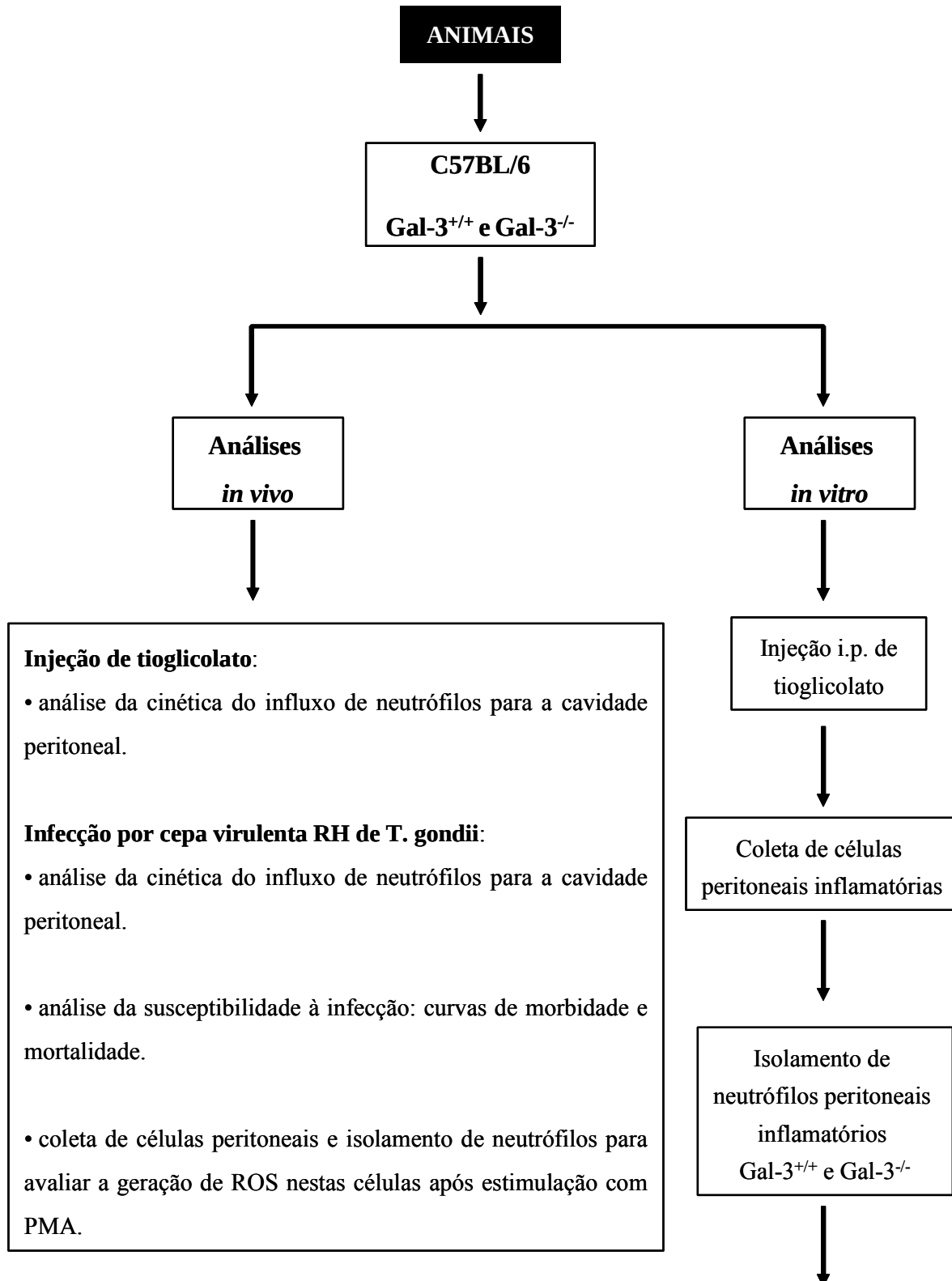
taquizoítas/mL em PBS. A suspensão parasitária foi tratada com inibidores de proteases (PMSF 1,6 mM, leupeptina 50 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL e benzamidina 10 µg/mL) e, então, submetida a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, seguido por seis ciclos de ultra-som durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação (10.000 x *g*, 30 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de 0,22 µm (filtros Millex, Millipore) e a concentração protéica determinada (LOWRY et al., 1951). Aliquotas do antígeno STAg foram armazenadas a – 20 °C até a sua utilização em ensaios de estimulação *in vitro*.

3.4.1 SDS-PAGE e Immunoblot

STAg (150 µg de proteína total) foi diluído em tampão de amostra e incubado por 5 minutos a 100 °C para análise por SDS-PAGE a 12% sob condições não-redutoras (LAEMMLI, 1970). Um volume de 150 µL (150 µg de proteína) do antígeno foi aplicado em paralelo aos padrões de pesos moleculares (Sigma Marker, Sigma Chemical Co.). Após a separação eletroforética, *immunoblot* foi realizado para verificar o perfil de reatividade do antígeno contra soros de camundongos hiperimunes contra a cepa RH de *T. gondii*, como descrito no item 3.2.2. Após a transferência, as membranas foram cortadas em tiras de 3 mm de largura e bloqueadas com PBS-TM 5% por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com soro ou IgG purificada de camundongo previamente imunizado com STAg, na diluição 1:50 em PBS-TM 1% por 18 horas a 4 °C sob agitação lenta. Como controle, soro ou IgG purificada de camundongo não-imune foi também incluído. Após este período de incubação as reações do *immunoblot* seguiram o mesmo protocolo descrito no item 3.2.2.

3.5 Modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* por cepa virulenta RH de *T. gondii*

Os modelos experimentais de infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} e *in vitro* de neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} por cepa virulenta RH de *T. gondii* e as subsequentes análises realizadas estão representados no fluxograma da ilustração 4.



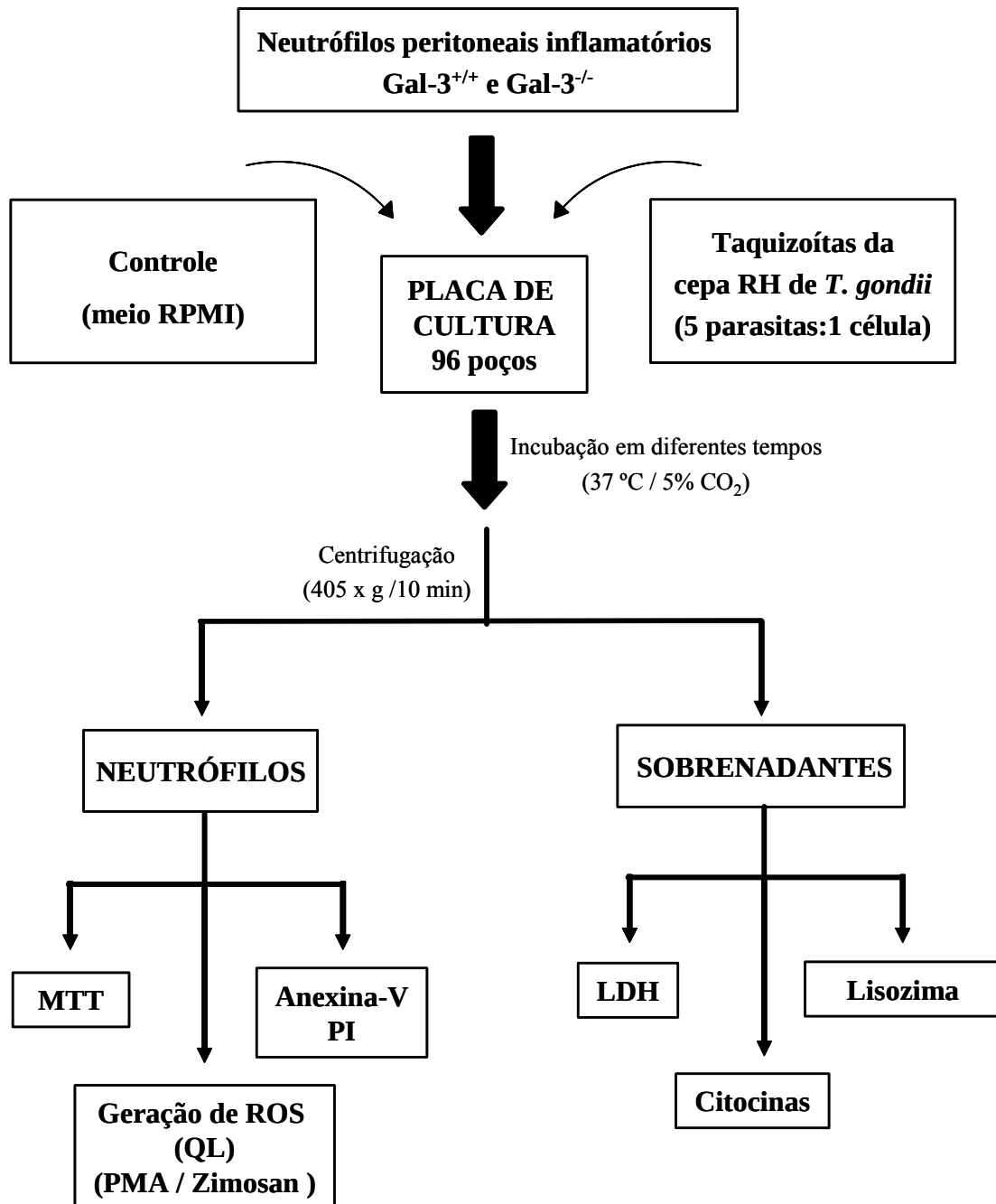


Ilustração 4. Fluxograma dos modelos experimentais de infecção *in vivo* e *in vitro* de camundongos C57BL/6 e de neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}.

3.6 Infecção de camundongos por *T. gondii* (cepa RH)

Camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (10 animais por grupo) foram infectados i.p. com 1×10^2 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (volume de 200 μ L em meio RPMI). Como controles, dois grupos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (quatro animais por grupo) foram inoculados com PBS. Os animais foram observados diariamente quanto a sinais clínicos e mortalidade. A avaliação dos sinais clínicos foi estabelecida utilizando um sistema baseado em escores como previamente descrito (BARTLEY et al., 2006), de acordo com os seguintes critérios: (0) pêlo brilhante, animal ativo, peso mantido; (1) pêlo ouriçado, animal relutante a se mover, perda de peso (aproximadamente 10%); (2) pêlo muito arrepiado, animal apático, perda de peso (aproximadamente 20%).

3.7 Indução da inflamação peritoneal

Camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (nove animais por grupo) foram injetados i.p. com 1 mL de tioglicolato 3% estéril ou PBS como controle negativo (BARON; PROCTOR, 1982). Após 3, 6 e 9 horas da injeção, três animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 4 mL de PBS estéril para a colheita de células peritoneais. Os exsudatos peritoneais obtidos foram lavados em PBS (405 x g, 10 minutos, 4 °C) e os sedimentos foram ressuspensos em meio completo. Aliquotas das células peritoneais foram analisadas para a contagem global e diferencial de leucócitos.

A contagem global foi realizada em câmara de Neubauer a partir da diluição de 10 μ L da suspensão de células de cada animal em 490 μ L de solução de Turk. A proporção de subpopulações de leucócitos foi determinada seguindo critérios morfológicos padrões em esfregaços corados com Giemsa. A contagem diferencial foi realizada em triplicata para cada amostra e 100 a 200 células foram contadas em cada lâmina, usando microscópio óptico e

objetiva de imersão (aumento 100 x). Os valores foram expressos como valores médios absolutos por mL, em relação ao número total de leucócitos.

Para avaliar o influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal induzido por *T. gondii*, camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (nove animais por grupo) foram inoculados i.p. (volume de 200 µL) com 1x10² taquizoítas da cepa RH ou exsudato peritoneal de camundongos Swiss não-infectados como controle. Células peritoneais foram recuperadas e analisadas após 3, 6 e 9 horas da inoculação, como descrito acima.

Alternativamente, zimosan, um polissacarídeo extraído da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Chemical Co.), foi avaliado quanto à capacidade para indução do influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6, como descrito anteriormente (KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001). Camundongos C57BL/6 (cinco animais por grupo) foram injetados i.p. com suspensão de zimosan (1,0 mg/0,5 mL de PBS) ou 1 mL de tioglicolato 3% estéreis. Células peritoneais inflamatórias foram recuperadas após 4 e 6 horas da injeção de zimosan e tioglicolato, respectivamente, e analisadas como descrito acima. Como controles, camundongos C57BL/6 (três animais por grupo) foram injetados com 0,5 ou 1,0 mL de PBS e os exsudatos peritoneais foram coletados após 4 ou 6 horas, respectivamente. Os resultados foram expressos em número médio absoluto de células por mL em relação ao número total de leucócitos.

A suspensão de zimosan foi preparada adicionando-se o zimosan a PBS previamente aquecido (50 °C), seguido de homogeneização para obtenção de uma suspensão uniforme e concentração final igual a 2 mg/mL. A suspensão de zimosan foi autoclavada a 120 °C durante 20 minutos para esterilização.

3.8 Isolamento de neutrófilos peritoneais inflamatórios

Exsudatos peritoneais inflamatórios foram obtidos a partir da cavidade peritoneal de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (três animais por grupo) após 6 horas da injeção i.p. de 1 mL de tioglicolato 3%, como descrito no item 3.6. Exsudatos peritoneais foram reunidos, homogeneizados e colocados sobre solução Ficoll-Hypaque (d = 1,077 g/mL; Sigma Chemical Co.) em tubos cônicos de centrifugação (15 mL) na proporção 5:1 (exsudato peritoneal:Ficoll-Hypaque) (WILKIE et al., 2007). O exsudato foi centrifugado a 1000 x g por 20 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi removido por aspiração e o sedimento, contendo neutrófilos, foi lavado duas vezes com meio RPMI a 405 x g por 10 minutos a 4 °C. As células foram tratadas com tampão de lise (NH₄Cl 0,16 M, Tris-HCl 0,17 M, pH 7,5) por 5 minutos a 37 °C para lisar eritrócitos remanescentes, quando necessário. Em seguida, neutrófilos presentes no sedimento foram novamente lavados com meio RPMI e ressuspensos em meio completo. A contagem de neutrófilos foi realizada em câmara de Neubauer a partir da diluição de 10 µL da suspensão de células em 490 µL de solução de Turk. Esta metodologia proporcionou preparação de células contendo 80-90% de neutrófilos e viabilidade maior que 95%, como determinado pela coloração com o corante de exclusão vital azul de Tripán 0,4%.

3.9 Infecção de neutrófilos *in vitro*

Os experimentos *in vitro* foram realizados com neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, cultivados em placas de 96 poços (Corning Incorporated Costar®, New York, EUA), em triplicata (100 µL células/poço), em meio completo e estimulados com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos:1 célula) (100 µL taquizoítas/poço). Como controle, neutrófilos não estimulados foram adicionados de meio RPMI somente. Em alguns experimentos, neutrófilos foram estimulados com parasitos

inativados pelo calor, parasitos opsonizados com IgG anti-*T. gondii* ou IgG irrelevante nas mesmas condições. Após a adição do estímulo, as células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ e analisadas em diferentes intervalos de tempo.

3.10 Ensaios de apoptose

Alterações apoptóticas precoces baseadas na exposição de fosfatidilserina (PS) foram identificadas por marcação de neutrófilos com anexina V-FITC (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Neutrófilos peritoneais inflamatórios (5×10^5 células/100 µL/poço) de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foram cultivados em placas de 96 poços e estimulados com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos:1 célula), como descrito no item 3.8. Após 30 minutos e 18 horas de estímulo, as placas de cultura foram centrifugadas a 405 x *g* por 10 minutos a 18 °C e os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -70 C° para posterior dosagem de lactato desidrogenase (LDH) e lisozima. Em seguida, as células foram transferidas para tubos de citometria de fluxo, lavadas com meio RPMI (405 x *g*, 10 minutos, 18 °C) e incubadas com 100 µL de solução de anexina V-FITC (99 µL de tampão de ligação + 1 µL de anexina V-FITC), por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Para diferenciar células em apoptose precoce e células mortas, neutrófilos foram adicionados de 100 µL de solução de iodeto de propídeo (PI) (99 µL de tampão de ligação + 1 µL de PI) imediatamente antes da análise. As amostras foram analisadas quanto à marcação simultânea para anexina V e PI por citometria de fluxo em um FACsort (Becton Dickinson, San Jose, EUA), usando-se um *software* CellQuest com contagem mínima de 20.000 eventos por amostra.

3.11 Análise da viabilidade celular

A função mitocondrial de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foi avaliada por ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983). Neutrófilos (2×10^5 células/100 μ L/poço) foram cultivados em placas de 96 poços e estimulados com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos:1 célula). Como controle, neutrófilos não estimulados foram adicionados de meio RPMI somente. Após diferentes intervalos de tempo, as placas de cultura foram centrifugadas a $405 \times g$ por 10 minutos a 18 °C e os sobrenadantes foram removidos. As células foram pulsadas com 100 μ L/poço de MTT (Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/mL, quatro horas antes do término do período de cultura e mantidas em condições de cultura. Em seguida, as placas de cultura foram novamente centrifugadas ($405 \times g$, 10 minutos, 18 °C) e os sobrenadantes foram descartados. Os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μ L/poço de SDS 10% e N,N-dimetil formamida 50%. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada após 30 minutos a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação aos controles.

Em outros experimentos, STAg em diferentes concentrações (25, 50 e 100 μ g/mL) também foi analisado como estímulo para neutrófilos (2×10^5 células/mL/poço) de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}. Após 30 minutos dos estímulos, a viabilidade celular foi avaliada por MTT, como descrito acima.

3.12 Análise da toxicidade celular

A toxicidade de *T. gondii* para neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foi avaliada pela determinação da atividade da enzima LDH em sobrenadantes de cultura (LUCISANO-VALIM et al., 2002). Neutrófilos (5×10^5 células/

100 µL/poço) foram cultivados em placas de 96 poços e estimulados ou não com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos:1 célula). Após 30 minutos e 18 horas de estímulo, as placas de cultura foram centrifugadas a 405 x *g* por 10 minutos a 18 °C e os sobrenadantes livres de células foram coletados de poços independentes, em triplicata, e armazenados a -70 °C. A atividade de LDH liberada nos sobrenadantes foi quantificada usando-se um kit comercial para diagnóstico, segundo as instruções do fabricante (LDH Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) e expressa em U/mL ou em quantidades relativas de LDH liberada em relação à lise celular total (controle positivo) obtida com Triton X-100 0,2% (% do total).

3.13 Análise de citocinas

Neutrófilos peritoneais inflamatórios (1×10^6 células/100 µL) de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foram estimulados ou não com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos:1 célula) e os sobrenadantes de cultura foram coletados de poços independentes, em triplicata, após 30 minutos e 18 horas de estimulação, e estocados a -70 °C para posterior análise de citocinas.

A dosagem das citocinas foi realizada pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes (IL-10, IL-12p70, IL-4 e IFN- γ , R&D Systems, Minneapolis, EUA; IL-6 e TNF- α , PeProtech México, Veracruz, México). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T e bloqueio com PBS contendo soroalbumina bovina (BSA) (Sigma Chemical Co.) 1% por 1 hora à temperatura ambiente, os sobrenadantes de cultura foram adicionados em duplicata. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura

ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados por 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H_2O_2 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A DO foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de detecção obtido para cada análise foi 15 pg/mL (IL-4), 31 pg/mL (IL-10 e IFN- γ), 39 pg/mL (IL-12 p70) e 390 pg/mL (IL-6 e TNF- α). Os coeficientes de variação intra-análise foram abaixo de 15%.

3.14 Análise da desgranulação de neutrófilos pela dosagem de lisozima

Neutrófilos peritoneais inflamatórios (5×10^5 células/100 μL /poço) de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foram cultivados em placas de 96 poços e estimulados ou não com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos:1 célula). Após 30 minutos e 18 horas de estímulo, as placas de cultura foram centrifugadas a 405 x *g* por 10 minutos a 18 °C e os sobrenadantes livres de células foram coletados de poços independentes, em triplicata, e armazenados a -70 °C para posterior quantificação de lisozima.

Os níveis de lisozima em sobrenadantes de cultura foram determinados segundo metodologia descrita por Smolelis e Hartsell (1949). Este método é baseado na habilidade desta enzima em lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*. Para a construção da curva padrão, diferentes concentrações (166, 333, 533, 666 e 1000 pg/mL) de lisozima-padrão (Sigma Chemical Co.) foram misturadas (vol/vol) com uma suspensão de *M. lysodeikticus* a 250 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0 ($\text{DO}_{450 \text{ nm}} = 0,6-0,8$) a 37 °C por 10

minutos. A curva padrão foi construída com os valores de redução da DO da suspensão de *M. lysodeikticus* e valores de concentração de lisozima-padrão correspondente.

Para quantificar a concentração de lisozima nos sobrenadantes de cultura, estas amostras foram diluídas 1:2 em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, misturadas (vol/vol) com a suspensão de *M. lysodeikticus* (250 µg/mL) e avaliadas quanto à capacidade de reduzir a DO_{450 nm} desta suspensão a 37 °C durante 10 minutos. Os valores de DO obtidos foram convertidos em picogramas (pg) de enzima liberada/mL/10 minutos, calculados pelos valores de atividade enzimática obtidos na curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager (Bio-Rad Laboratories Inc.).

3.15 Análise do metabolismo gerador de ROS por quimioluminescência dependente de luminol

Os ensaios de quimioluminescência (QL) dependente de luminol (QLlum) foram realizados em experimentos *in vitro* e *in vivo*, segundo metodologia previamente descrita (CHEUNG; ARCHIBALD; ROBINSON, 1983; ALVES et al., 2003). O método é baseado no princípio de que quando neutrófilos são ativados, ROS liberadas podem transferir, por meio de reação de oxigenação, o luminol a um estado excitado e, portanto, induzir a emissão de luz a partir deste reagente quimioluminogênico.

3.15.1 Geração de ROS *in vitro*

Neutrófilos peritoneais inflamatórios (5×10^5 células/100 µL) de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foram cultivados em placas de 96 poços sob diferentes estímulos: taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5 parasitos:1 célula), parasitos inativados pelo calor, parasitos opsonizados com IgG anti-RH ou IgG irrelevante e controle (somente meio RPMI). Após 30 minutos e 18 horas de estimulação, neutrófilos foram misturados com 245 µL de solução HBSS (solução

salina balanceada de Hanks), 5 μL de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) 280 μM e incubados a 37 °C por 2 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com 50 μL de acetato de forbol miristato (PMA) 10^{-7} M. Os controles de QLlum espontânea consistiram da incubação de células e luminol em HBSS, na ausência de PMA. A produção de QLlum, equivalente à geração de ROS (espécies reativas de oxigênio), foi acompanhada em um luminômetro (Auto Lumat LB 953; Berthold, Bad Wildbad, Germany) a 37 °C por 20 minutos e registrada em cpm (contagens por minuto). Os resultados foram expressos como perfis de QLlum e área integrada sob a curva dos perfis de QLlum (média $\pm$ SD).

Alternativamente, ensaios de QLlum foram realizados com zimosan (0,25 e 0,50 mg/mL), preparado como abaixo descrito (item 3.14.2), como estímulo para indução da geração de ROS em neutrófilos estimulados por 30 minutos com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* ou taquizoítas inativados e opsonizados com IgG anti-RH (5 parasitos:1 célula).

Em alguns experimentos *in vitro*, neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foram estimulados com STAg em diferentes concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e, após 30 minutos de estimulação, a geração de ROS foi analisada por QLlum como acima descrito.

3.15.2 Preparação de zimosan

Vinte miligramas de zimosan (Sigma Chemical Co.) foram ressuspenso em 15 mL de solução NaCl 0,15 M e fervidos em banho-maria durante 30 minutos. Após a fervura, a suspensão de zimosan foi centrifugada a 405 x *g* por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de soro humano normal, diluído 1:2 em HBSS e mantido a 37 °C por 30 minutos para opsonização por proteínas do complemento e anticorpos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 720 x *g* por 5 minutos

e o sedimento foi lavado duas vezes com HBSS (720 x g, 5 minutos). A concentração da suspensão de zimosan foi ajustada para 4 mg/mL em solução HBSS.

3.15.3 Geração de ROS *in vivo*

Para os experimentos *in vivo*, neutrófilos peritoneais inflamatórios foram isolados de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, infectados ou não com *T. gondii*, após 1, 3 e 5 dias de infecção. Em seguida, neutrófilos (5x10⁵ células/100 µL) foram misturados com 345 µL de solução HBSS e 5 µL de luminol 280 µM, e incubados a 37 °C por 2 minutos. A estimulação para a geração de ROS foi realizada com 50 µL de PMA 10⁻⁷ M. Os controles de QLlum espontânea consistiram da incubação de células e luminol em HBSS, na ausência de PMA. A produção de QLlum e resultados foram analisados como descrito para os experimentos *in vitro*.

3.16 Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). O método de Kaplan-Meier foi aplicado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes em cada ponto de tempo após a infecção e as curvas de sobrevida foram comparadas pelo teste Log rank. A comparação dos dados obtidos foi analisada por testes paramétricos, após a verificação pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov que as variáveis exibiam distribuição normal. O teste *t* de Student foi utilizado para comparação dos dados obtidos entre camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, bem como entre grupos infectados por *T. gondii* e grupo controle. As diferenças entre os tempos após inoculação de estímulos para influxo de leucócitos peritoneais foram analisadas por ANOVA seguido do teste de comparação múltipla

de Tukey para examinar todas as possíveis comparações entre pares de grupos. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$ (MINEO et al., 2005).

4 RESULTADOS

4.1 PARTE I: PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

4.1.1 Padronização dos estímulos para indução do influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6

No início deste estudo, dois estímulos foram comparados quanto à capacidade para indução do influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+}: tioglicolato e zimosan. O tioglicolato é bem descrito na literatura como um agente elicitante para macrófagos (COHN, 1978; DEN OTTER et al., 1982; LEIJH et al., 1984) e neutrófilos (BARON e PROCTOR, 1982); e o zimosan tem sido utilizado para indução de peritonite em modelos murinos de inflamação aguda, caracterizada por marcada biossíntese de eicosanóides e predomínio de neutrófilos na população de leucócitos polimorfonucleares em exsudatos peritoneais obtidos 4 horas após da injeção intraperitoneal de zimosan (1 mg/0,5 mL de PBS) (DOHERTY, et al., 1985; RAO et al., 1994; STEPHEN, et al., 1997; KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001).

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que ambos os estímulos foram eficientes em elicitar influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+}, comparados aos respectivos controles ($p < 0,05$). Além disto, houve uma significativa predominância de neutrófilos quando comparado a linfócitos, nos exsudatos obtidos a partir de animais injetados com tioglicolato ou zimosan ($p < 0,05$). Entretanto, o número de leucócitos e de neutrófilos presentes em exsudatos obtidos de animais injetados com zimosan foram significativamente maiores que aqueles obtidos com tioglicolato ($p < 0,05$).

Tabela 1. Influxo de leucócitos peritoneais de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} para a cavidade peritoneal após injeção de tioglicolato ou zimosan.

Estímulo	Leucócitos totais x 10⁶ (n)	Neutrófilos x 10⁶ (n)	Linfócitos x 10⁶ (n)
Tioglicolato	43,58 ± 1,23 [#]	27,72 ± 1,05 ^{#, Φ}	14,23 ± 1,07 ^{#, *}
(6 h)	(5)	(5)	(5)
Zimosan	87,83 ± 2,75 ^{#, *}	76,28 ± 3,75 ^{#, Φ, *}	8,16 ± 1,04 [#]
(4 h)	(5)	(5)	(5)
PBS	4,36 ± 1,75	0,48 ± 0,02	3,71 ± 0,10 ^Φ
(6 h)	(3)	(3)	(3)
PBS	4,30 ± 0,20	0,48 ± 0,25	3,56 ± 1,97 ^Φ
(4 h)	(3)	(3)	(3)

Camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (n = 5 por grupo) foram injetados i.p. com tioglicolato 3% ou zimosan (1,0 mg/0,5 mL). Leucócitos peritoneais inflamatórios totais obtidos após 4 e 6 horas da injeção de zimosan ou tioglicolato, respectivamente, foram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer. A contagem diferencial de leucócitos foi determinada de acordo com critérios morfológicos padrões em esfregaços corados com Giemsa. Como controles, camundongos C57BL/6 (n = 3 por grupo) foram injetados com 0,5 ou 1,0 mL de PBS e o exudato peritoneal foi coletado após 4 ou 6 horas, respectivamente. Os resultados estão expressos em número de células por mililitro de exsudato peritoneal (média ± SD).

[#] Comparação entre as populações celulares em cada estímulo vs controle; ^Φ Comparação entre neutrófilos e linfócitos em cada estímulo (teste *t* de Student, *p* < 0,05); * Comparação das populações de leucócitos, neutrófilos, linfócitos entre os diferentes estímulos (ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas, *p* < 0,05).

4.1.2 Avaliação da geração de ROS em neutrófilos peritoneais inflamatórios

Após a observação de que ambos, tioglicolato e zimosan, eram eficientes em induzir influxo de leucócitos, com predominância de neutrófilos, para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+}, foi avaliada a geração de ROS em neutrófilos obtidos a partir de exsudatos peritoneais de animais injetados com tioglicolato ou zimosan.

4.1.2.1 Padronização da concentração de neutrófilos para os ensaios de quimioluminescência dependente de luminol

Neutrófilos peritoneais inflamatórios ($0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$ e 2×10^6 /mL) obtidos de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} injetados com tioglicolato ou zimosan foram estimulados *in vitro* com PMA e a geração de ROS foi medida pela produção de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) a 37 °C, por 20 minutos.

As medidas de QLlum obtidas a partir de diferentes concentrações de neutrófilos peritoneais inflamatórios estão demonstradas na Figura 1. Os valores de QLlum em cada preparação de células subtraindo-se a liberação espontânea de ROS estão representados na Figura 1A. A produção de QLlum por neutrófilos peritoneais inflamatórios de animais injetados com tioglicolato aumentou de maneira dose-dependente da concentração de neutrófilos, enquanto a produção de QLlum por neutrófilos de animais injetados com zimosan atingiu um valor máximo com 1×10^6 células/mL (Figura 1A). Além disto, a QLlum produzida por neutrófilos dos animais injetados com tioglicolato foi significativamente maior que aquela de neutrófilos de animais injetados com zimosan em todas as concentrações de neutrófilos avaliadas ($p < 0,05$).

Com base nesses resultados, tioglicolato foi selecionado como o melhor estímulo a ser utilizado para indução de inflamação peritoneal e subsequente isolamento de neutrófilos peritoneais inflamatórios em camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+}. Considerando que neutrófilos

são populações celulares obtidas em números reduzidos a partir de camundongos e que a QLlum produzida por 1×10^6 neutrófilos/mL foi adequada para a avaliação da geração de ROS, esse número de células foi escolhido para os ensaios de QLlum realizados nos experimentos subsequentes.

Embora o zimosan tenha sido um estímulo mais potente na indução de leucócitos, com predominância de neutrófilos (Tabela 1), para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+}, comparado ao tioglicolato, os neutrófilos isolados a partir de células peritoneais obtidas de animais injetados com suspensão de zimosan exibiram menor geração de ROS detectável por QLlum (Figura 1A). Este fenômeno provavelmente ocorreu porque o zimosan constitui uma suspensão de partículas que ao serem injetadas i.p. induzem uma resposta inflamatória com recrutamento de neutrófilos, células estas que fagocitam partículas de zimosan, sendo este fenômeno acompanhado de uma explosão geradora de ROS (KANASHIRO et al., 2004). Assim, sugerimos que os neutrófilos isolados após a injeção de suspensão de zimosan são, em sua maioria, células que já realizaram o processo de fagocitose e liberação de ROS e, portanto, ao serem estimuladas *in vitro* com PMA exibem uma menor resposta oxidativa medida por QLlum.

O perfil da produção de QLlum exibido pela concentração otimizada de 1×10^6 neutrófilos/mL estimulados com PMA, registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo (20 minutos) está ilustrado na Figura 1B.

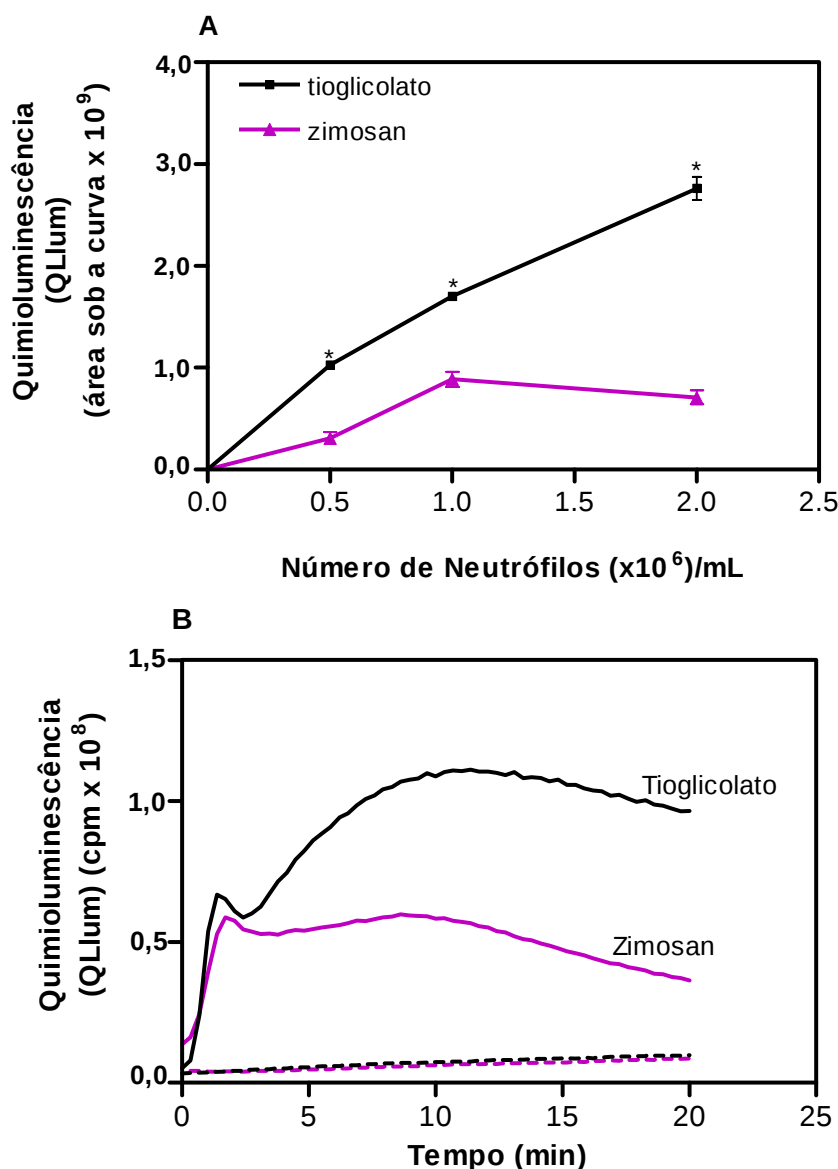


Figura 1. Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) produzida por neutrófilos peritoneais inflamatórios obtidos de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} injetados com 1 mL de tioglicolato 3% ou zimosan (1 mg/0,5mL) após 6 ou 4 horas, respectivamente, e estimulados *in vitro* com PMA (10^{-7} M) por 20 minutos. **(A)** Valores de QLlum (■, ▲: valores correspondentes às áreas integradas sob as curvas dos perfis de QLlum para cada concentração de neutrófilos) (média $\pm$ SD) produzida por diferentes concentrações de neutrófilos. Os valores de liberação espontânea de espécies reativas de oxigênio (ROS) em cada preparação de célula, na ausência de PMA, foram descontados. **(B)** Perfis de QLlum produzida por 1×10^6 neutrófilos/mL, registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo. As linhas pontilhadas e as linhas contínuas representam, respectivamente, a liberação espontânea e estimulada por PMA de espécies reativas de oxigênio. * Significância estatística comparado a zimosan (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

4.1.2.2 Padronização da concentração de PMA para os ensaios de quimioluminescência dependente de luminol

Neutrófilos peritoneais inflamatórios (1×10^6 células/mL) obtidos a partir de exsudato peritoneal de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} injetados com 1 mL de tioglicolato 3%, foram estimulados com diferentes concentrações de PMA e a produção de ROS foi medida por QLlum a 37 °C por 20 minutos.

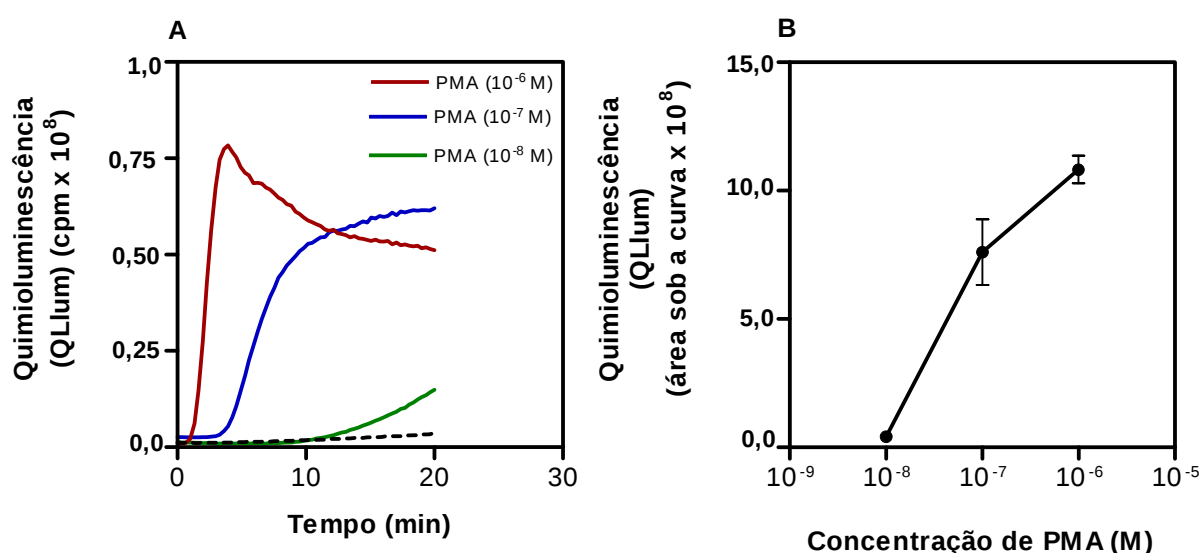


Figura 2. Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) produzida por neutrófilos peritoneais inflamatórios (1×10^6 células/mL) obtidos a partir de exsudato peritoneal de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} injetados com 1 mL de tioglicolato 3% e estimulados *in vitro* com diferentes concentrações de PMA (10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M) por 20 minutos. **(A)** Perfis de QLlum produzida por neutrófilos, registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo. As linhas pontilhadas e as linhas contínuas representam, respectivamente, a liberação espontânea e estimulada por PMA de espécies reativas de oxigênio. **(B)** Valores de QLlum (●: valores correspondentes às áreas integradas sob as curvas dos perfis de QLlum para cada concentração de PMA) (média $\pm$ SD) produzida por neutrófilos estimulados com diferentes concentrações de PMA. Os valores de liberação espontânea de ROS, na ausência de PMA, foram descontados.

Como demonstrado na Figura 2, a maior concentração de PMA (10^{-6} M) induziu uma abrupta explosão no metabolismo gerador de ROS, enquanto a menor concentração (10^{-8} M) não induziu significativa produção de QLlum (Figura 2A). Em contraste, a concentração de 10^{-7} M de PMA mostrou uma curva sigmóide de QLlum em função do tempo (Figura 2A), caracterizando uma resposta de produção de ROS intensa e prolongada. A figura 2B mostra uma curva dose-resposta para produção de QLlum em função da concentração de PMA. Com base nesses resultados, a concentração de 10^{-7} M de PMA foi selecionada para ser utilizada nos ensaios para análise da geração de ROS em neutrófilos nos experimentos subsequentes.

4.1.2.3 Padronização da concentração de zimosan para os ensaios de quimioluminescência dependente de luminol

Neutrófilos peritoneais inflamatórios (1×10^6 células/mL) de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} foram estimulados com diferentes concentrações (0,125 - 0,25 - 0,5 - 1.0 mg/mL) de zimosan opsonizado com soro humano normal (ZiOps) e a produção de ROS foi medida por QLlum a 37 °C por 20 minutos.

Após a opsonização de zimosan com componentes do sistema complemento e anticorpos naturais presentes no soro, a suspensão mimetiza um microrganismo opsonizado e desencadeia a fagocitose envolvendo receptores de membrana para complemento e porção Fc de IgG (FcγR) (KANASHIRO, 2004). A ativação promovida por este estímulo envolve a ativação de fosfolipase A2 (PLA2) e consequente produção de ácido araquidônico e ativação das fosfolipases C (PLC) e D (PLD) (CABANIS et al., 1996).

O perfil da resposta de QLlum produzida por neutrófilos estimulados com diferentes concentrações de zimosan em função do tempo está demonstrado na figura 3A. Os valores de QLlum (média $\pm$ SD) para cada concentração de zimosan utilizada estão apresentados na figura 3B, sendo os valores de liberação espontânea de ROS, na ausência de zimosan,

descontados. Observou-se que neutrófilos peritoneais inflamatórios produziram ROS em resposta à estimulação por ZiOps de maneira dose-dependente da concentração deste polissacarídeo (Figura 3B). Uma vez que a estimulação do metabolismo gerador de ROS induzida por zimosan é um fenômeno dependente de receptor, as concentrações de ZiOps selecionadas para utilização nos experimentos subsequentes foram 0,25 e 0,50 mg/mL, já que concentrações maiores poderiam provocar a saturação de receptores na superfície celular.

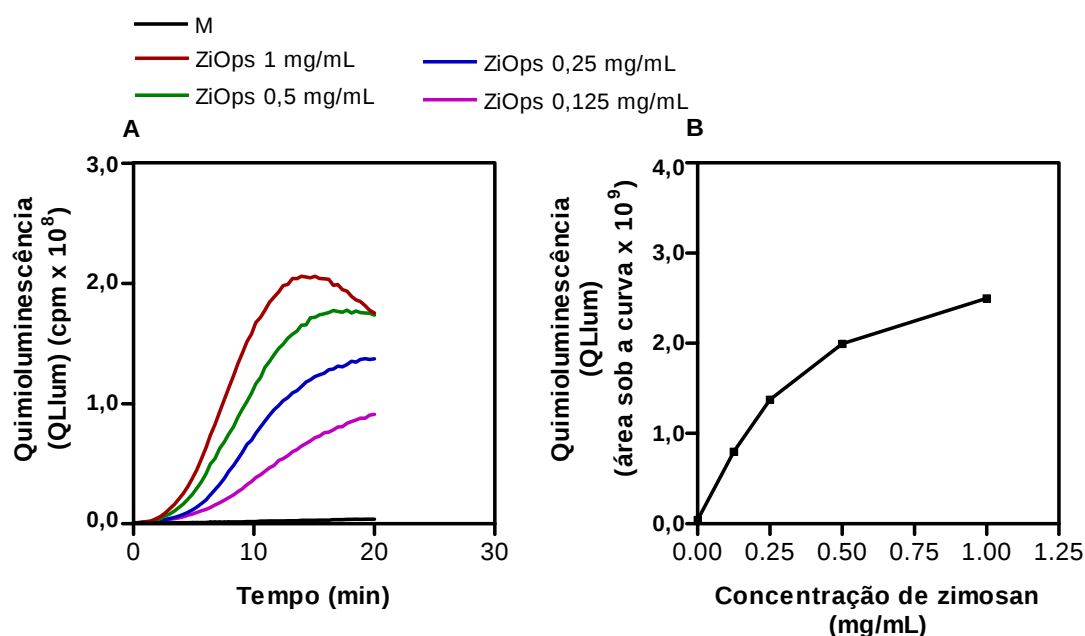


Figura 3. Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) produzida por neutrófilos peritoneais inflamatórios (1×10^6 células/mL) estimulados *in vitro* com diferentes concentrações de zimosan opsonizado com soro humano normal (ZiOps): 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL por 20 minutos. **(A)** Perfis de QLlum produzida por neutrófilos registrada em contagens por minuto (cpm) em função do tempo. As linhas pontilhadas e as linhas contínuas representam, respectivamente, a liberação espontânea (Meio: solução HBSS) e estimulada por ZiOps de espécies reativas de oxigênio (ROS). **(B)** Valores de QLlum (■: valores correspondentes às áreas integradas sob as curvas dos perfis de QLlum para cada concentração de ZiOps) (média $\pm$ SD) produzida por neutrófilos. Os valores de liberação espontânea de ROS, na ausência de ZiOps, foram descontados.

4.1.3 Detecção de galectina-3 em lisados de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

Para caracterizar fenotipicamente os camundongos utilizados neste estudo, a expressão de galectina-3 foi verificada por *immunoblot* em lisados de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} elicitados por tioglicolato 3%.

Foi detectada reatividade a uma banda com massa molecular aparente de 30 kDa em lisado de macrófagos peritoneais de camundongos Gal-3^{+/+}, comparativamente a um componente de 29 kDa detectado em lisado de células HeLa, que serviram como controle positivo para galectina-3 (Figura 4). Como esperado, galectina-3 não foi detectada em lisados de macrófagos de camundongos Gal-3^{-/-}.

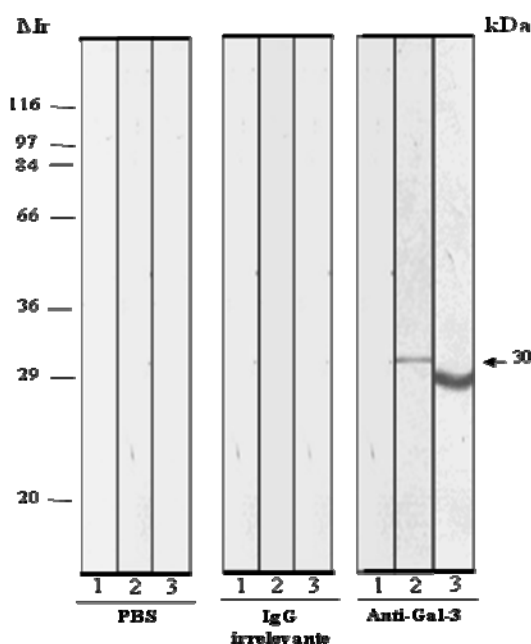


Figura 4. Análise por *immunoblot* da expressão de galectina-3 em macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}. Macrófagos peritoneais (3×10^5 células/mL) obtidos 72 horas após injeção i.p. de tioglicolato 3% foram lisados e analisados para galectina-3 por *immunoblot*, utilizando anticorpo primário monoclonal anti-Gal-3. Controles do anticorpo primário incluíram IgG irrelevante ou diluente (PBS). Linha 1: lisados de macrófagos Gal-3^{-/-}; Linha 2: lisados de macrófagos Gal-3^{+/+}; Linha 3: lisados de células HeLa (controle positivo). Marcadores de massas moleculares (Mr) são expressos em kiloDaltons (kDa). Seta à direita indica a marcação para galectina-3 (30 kDa).

4.1.4 Reação de imunofluorescência com taquizoítas de *T. gondii* opsonizados

A concentração de anticorpo IgG de camundongo anti-*T. gondii* necessária para opsonizar taquizoítas da cepa RH (5×10^6 taquizoítas/mL em RPMI) sem promover a aglutinação dos parasitos foi verificada por reação de imunofluorescência (Figura 5). Foi observada maior intensidade de marcação dos taquizoítas quando opsonizados com a concentração a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ de IgG anti-*T. gondii* (Figuras 5C e 5D). Entretanto, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, observou-se aglutinação dos taquizoítas (Figura 5D). Controles negativos (IgG irrelevante ou diluente PBS) não exibiram qualquer marcação dos taquizoítas (Figura 5E). Portanto, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de IgG anti-*T. gondii* foi escolhida para a opsonização dos taquizoítas nos experimentos subsequentes.

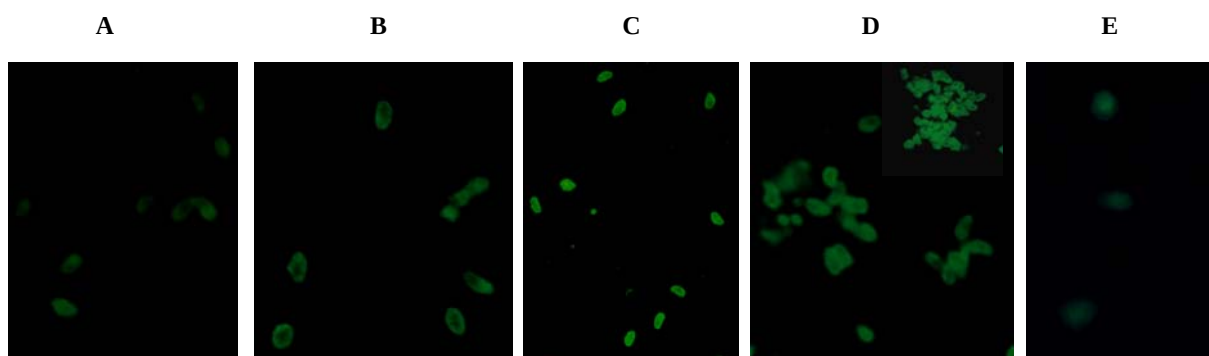


Figura 5. Fotomicrografia representativa de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (5×10^6 taquizoítas/mL em RPMI) após inativação pelo calor (56 °C por 30 minutos) e opsonização (4 °C por 30 minutos) com IgG de camundongo anti-*T. gondii* nas concentrações de 25 (A), 50 (B), 100 (C) e 200 (D) $\mu\text{g/mL}$ em reação de imunofluorescência. Como controle negativo, IgG irrelevante na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (E).

4.1.5 Immunoblot do antígeno solúvel de *T. gondii*

O perfil antigênico do STAg analisado com soros de camundongos hiperimunes contra a cepa RH de *T. gondii* ou IgG purificada anti-RH e respectivos controles está ilustrado na Figura 6. Foi observado forte marcação dos principais antígenos imunodominantes de *T. gondii* (p22, p30, p43 e p97) tanto pelo soro policlonal positivo como IgG purificada contra a cepa RH. Nenhuma marcação foi evidenciada por soros controles negativos ou IgG irrelevante ou diluente somente.

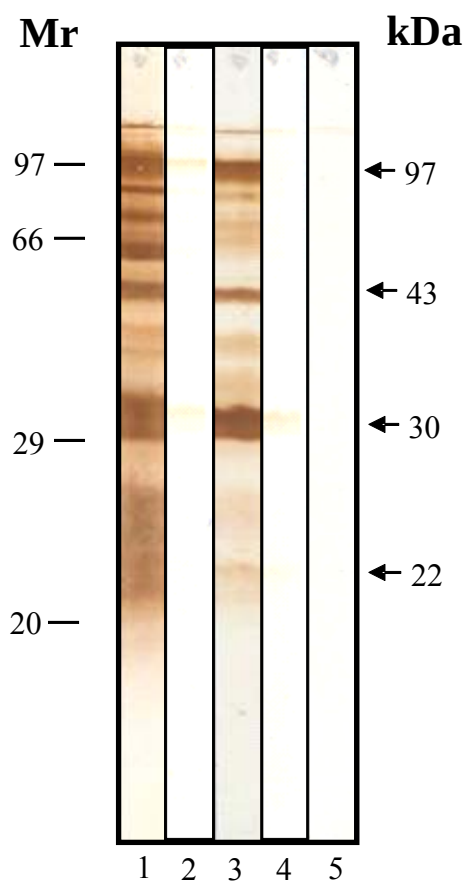


Figura 6. Immunoblot do antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) testado com soro de camundongo hiperimune contra *T. gondii* cepa RH (linha 1), soro de camundongo não-imune (linha 2), IgG de camundongo purificada anti-RH (linha 3), IgG de camundongo purificada irrelevante (linha 4) e PBS (linha 5). Marcadores de massas moleculares (Mr) e antígenos imunodominantes de *T. gondii* são expressos em kiloDaltons (kDa).

4.1.6 Viabilidade celular de neutrófilos estimulados com STAg

Para verificar a toxicidade do STAg em diferentes concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) sobre neutrófilos de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, a viabilidade celular foi avaliada após 30 minutos de estimulação com o antígeno pelo método de conversão do MTT. Os resultados mostraram que a viabilidade de neutrófilos Gal-3^{+/+} ou Gal-3^{-/-} não foi alterada pelo antígeno nas diferentes concentrações empregadas (Figura 7).

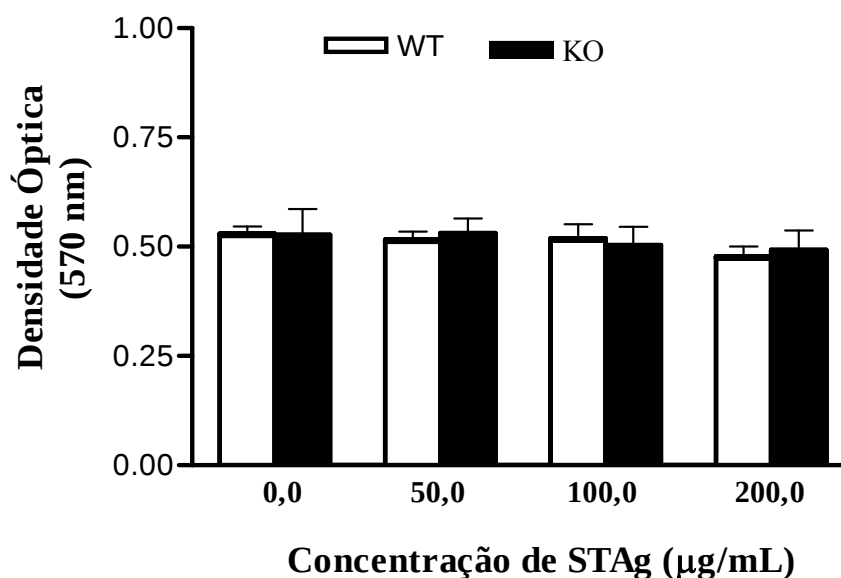


Figura 7. Viabilidade de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após estimulação *in vitro* com diferentes concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) do antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg). Neutrófilos (2×10^5 células/100 μL /poço) foram cultivados em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO_2 e a viabilidade celular foi analisada usando o método de conversão de MTT após 30 minutos de estimulação. Dados estão expressos como média $\pm$ SD de valores de densidade óptica (570 nm) e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata.

4.2 PARTE II: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA GALECTINA-3 SOBRE FUNÇÕES DE NEUTRÓFILOS DURANTE A INFECÇÃO POR CEPA VIRULENTE RH DE *TOXOPLASMA GONDII* EM CAMUNDONGOS C57BL/6

4.2.1 Efeito da galectina-3 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos após inflamação peritoneal induzida por tioglicolato ou *T. gondii*

Para verificar o efeito da Gal-3 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, a inflamação peritoneal induzida por tioglicolato ou *T. gondii* foi analisada em camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (Figura 8). Foram observadas concentrações significativamente menores de neutrófilos peritoneais inflamatórios em animais Gal-3^{-/-} comparado a Gal-3^{+/+}, após 3, 6 e 9 horas da injeção de tioglicolato, embora um significativo recrutamento de neutrófilos em relação ao controle (PBS) foi encontrado em ambas as linhagens de camundongos em todos os tempos analisados ($p < 0,05$) (Figura 8A). O pico do influxo de neutrófilos peritoneais inflamatórios ocorreu após 6 horas da injeção de tioglicolato em ambos os camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, mas predominância de neutrófilos em relação a linfócitos foi encontrada apenas em camundongos Gal-3^{+/+} neste período de tempo ($p < 0,05$).

Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi observada no recrutamento de neutrófilos induzido por *T. gondii* entre camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (Figura 8B). Embora um maior número de linfócitos do que neutrófilos tenha sido observado em todos os períodos de tempo analisados, o pico de neutrófilos peritoneais inflamatórios ocorreu após 3 horas de infecção por *T. gondii* com concentrações significativamente maiores em relação ao controle ($p < 0,05$). Em contraste, o exsudato não-infectado (controle) induziu um significativo pico de neutrófilos peritoneais inflamatórios após 6 horas de injeção, comparado à infecção por *T. gondii* em ambos os genótipos ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que na ausência de Gal-3, níveis diminuídos de neutrófilos foram recrutados para a cavidade peritoneal após injeção de

tioglicolato (Figura 8A), mas sob estímulo de infecção por *T. gondii*, a ausência de Gal-3 não afeta o recrutamento de neutrófilos (Figura 8B).

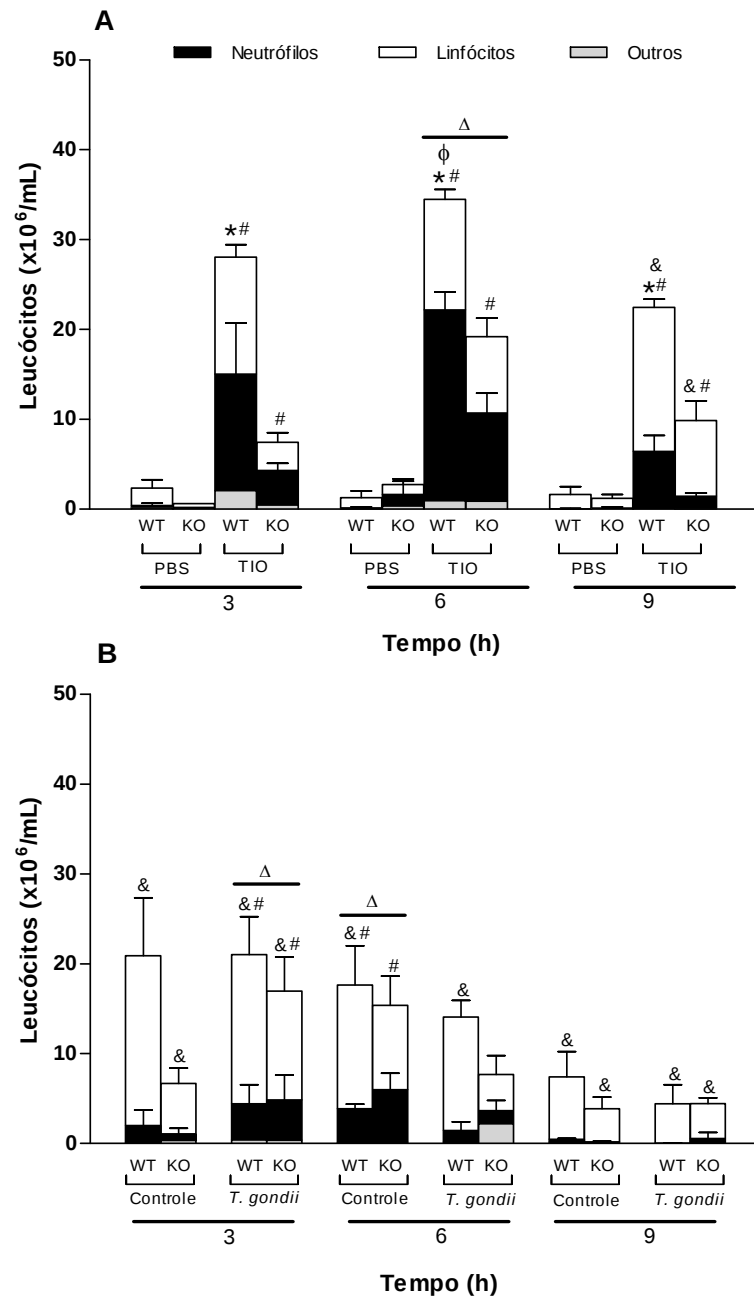


Figura 8. Influxo de leucócitos peritoneais inflamatórios em camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO). Camundongos (n = 3 por grupo) foram injetados intraperitonealmente com 1 mL de tioglicolato 3% ou PBS (A) ou com 0,2 mL de 1×10^2 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* ou exsudato peritoneal de camundongos Swiss não-infectados (controle) (B). Células peritoneais foram coletadas após 3, 6 e 9 horas de injeção e analisadas para contagem diferencial de leucócitos em esfregaços corados com Giemsa. Os dados estão expressos como média $\pm$ SD e são representativos de dois experimentos independentes. * Comparação da contagem de neutrófilos entre camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} para cada condição; # Comparação da contagem de neutrófilos em relação ao controle em cada linhagem de camundongo e tempo de estimulação; Φ Predominância de neutrófilos em relação a linfócitos, & predominância de linfócitos em relação a neutrófilos (teste t de Student, p < 0,05); Δ Significância estatística para o pico de influxo de neutrófilos entre os diferentes tempos após a inoculação (ANOVA seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas, p < 0,05).

4.2.2 Papel da galectina-3 na infecção *in vivo* por cepa virulenta de *T. gondii*

Para avaliar o papel da Gal-3 durante infecção *in vivo* com cepa virulenta de *T. gondii*, camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foram infectados intraperitonealmente com 1×10^2 taquizoítas da cepa RH e monitorados para a sobrevivência e escores de morbidade (Figura 9). Ambos os camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} apresentaram sinais clínicos após 6 dias da infecção (Figura 9B), alcançando o pico de morbidade máxima no 7º dia, seguindo com altas taxas de mortalidade (70-80%) entre 7 e 8 dias após a infecção (Figura 9A). Embora camundongos Gal-3^{-/-} mostraram menor porcentagem de sobrevivência comparada a camundongos Gal-3^{+/+}, esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Entretanto, as curvas de sobrevida e escores de morbidade de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} inoculados com *T. gondii* foram significativamente diferentes em relação aos controles ($p < 0,05$). Estes achados demonstram que na ausência de Gal-3, a sobrevida de camundongos C57BL/6 após infecção com a cepa virulenta RH de *T. gondii* não foi alterada.

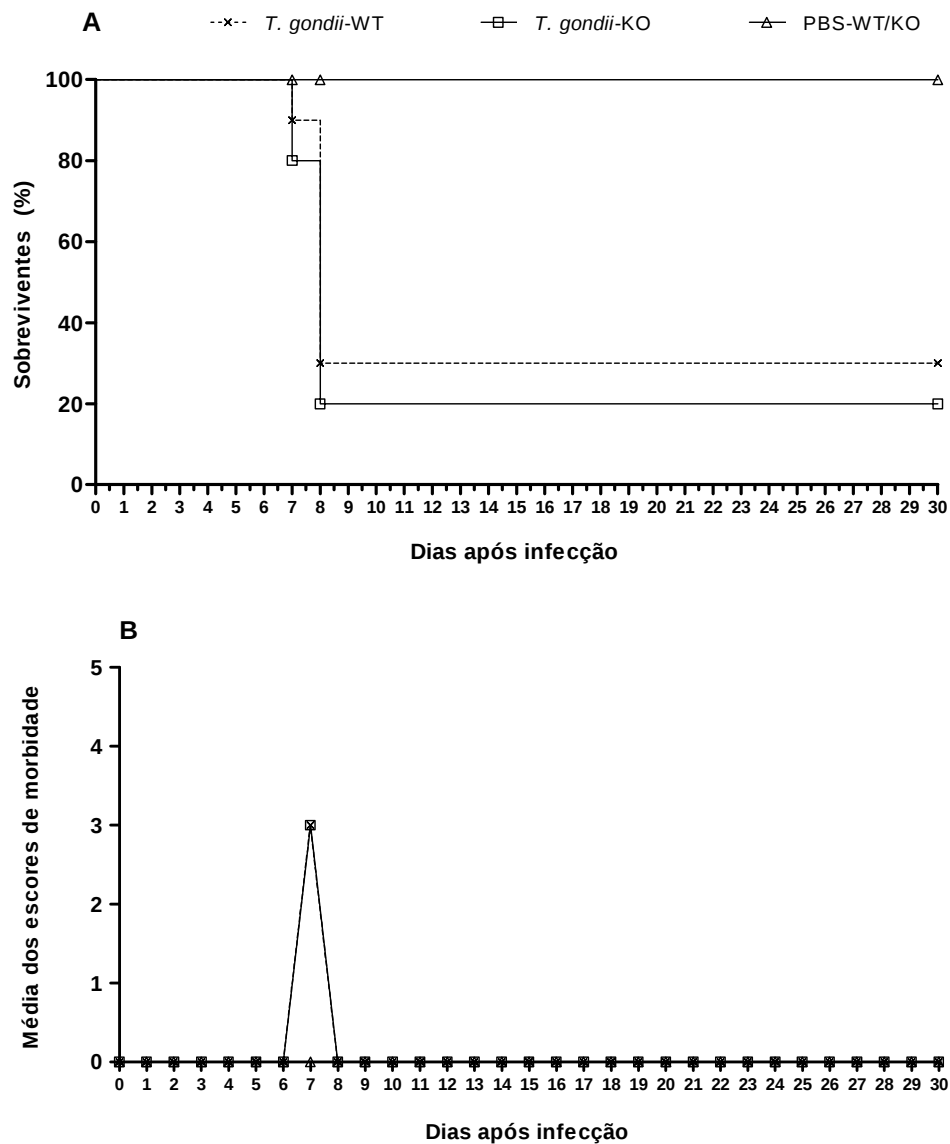


Figura 9. Curvas de sobrevivência (**A**) e escores médios de morbidade (**B**) de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT, n = 10) e Gal-3^{-/-} (KO, n = 10) após infecção com 1×10^2 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* ou PBS (controle). Os escores de morbidade foram estabelecidos como previamente descrito (BARTLEY et al., 2006), de acordo com os seguintes critérios: (0) pêlo brilhante, animal ativo, peso mantido; (1) pêlo ouriçado, animal relutante a se mover, perda de peso (aproximadamente 10%); (2) pêlo muito arrepiado, animal apático, perda de peso (aproximadamente 20%). Os dados são representativos de três experimentos independentes. Curvas de sobrevivência e escores médios de morbidade de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} inoculados com *T. gondii* foram significativamente diferentes em relação ao controle (teste Log rank, $p < 0,05$).

4.2.3 Efeito da galectina-3 sobre a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos infectados com a cepa virulenta RH de *T. gondii*

Para verificar se Gal-3 interfere com a geração de ROS por neutrófilos peritoneais inflamatórios obtidos de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} infectados com a cepa virulenta RH de *T. gondii* após 1, 3 e 5 dias de infecção, a ativação do metabolismo gerador de ROS induzida por PMA nestas células foi medida por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) (Figura 10). Após 1 dia de infecção (Figura 10A), respostas de QLlum foram aumentadas em neutrófilos Gal-3^{+/+} e diminuídas em neutrófilos Gal-3^{-/-}, comparado aos respectivos controles ($p < 0,05$). Além disto, respostas de QLlum foram maiores em neutrófilos Gal-3^{+/+} comparado a Gal-3^{-/-} neste período de tempo da infecção ($p < 0,05$). Após 3 dias de infecção (Figura 10B), o mesmo perfil de resposta de QLlum foi mantido, com QLlum aumentada em neutrófilos Gal-3^{+/+} e diminuída em neutrófilos Gal-3^{-/-} ($p < 0,05$), comparados aos respectivos controles. Entretanto, respostas de QLlum não foram significativamente diferentes entre ambos os genótipos neste ponto de tempo de infecção ($p > 0,05$). Por outro lado, após 5 dias de infecção (Figura 10C), ambos os neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} exibiram respostas de QLlum diminuídas em relação aos controles, embora neutrófilos Gal-3^{+/+} apresentaram maior resposta de QLlum comparados a neutrófilos Gal-3^{-/-} ($p < 0,05$). Em todos os períodos de tempo de infecção, respostas de QLlum em neutrófilos Gal-3^{-/-} foram maiores do que em neutrófilos Gal-3^{+/+} nos grupos controles não-infectados ($p < 0,05$).

É importante ressaltar que a infecção por *T. gondii* não alterou a liberação espontânea de ROS em relação aos controles em ambos os genótipos de neutrófilos e em todos os pontos de tempo analisados.

Os dados obtidos sugerem que a ativação do metabolismo gerador de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos infectados com a cepa virulenta RH de *T. gondii* foi modulada por Gal-3.

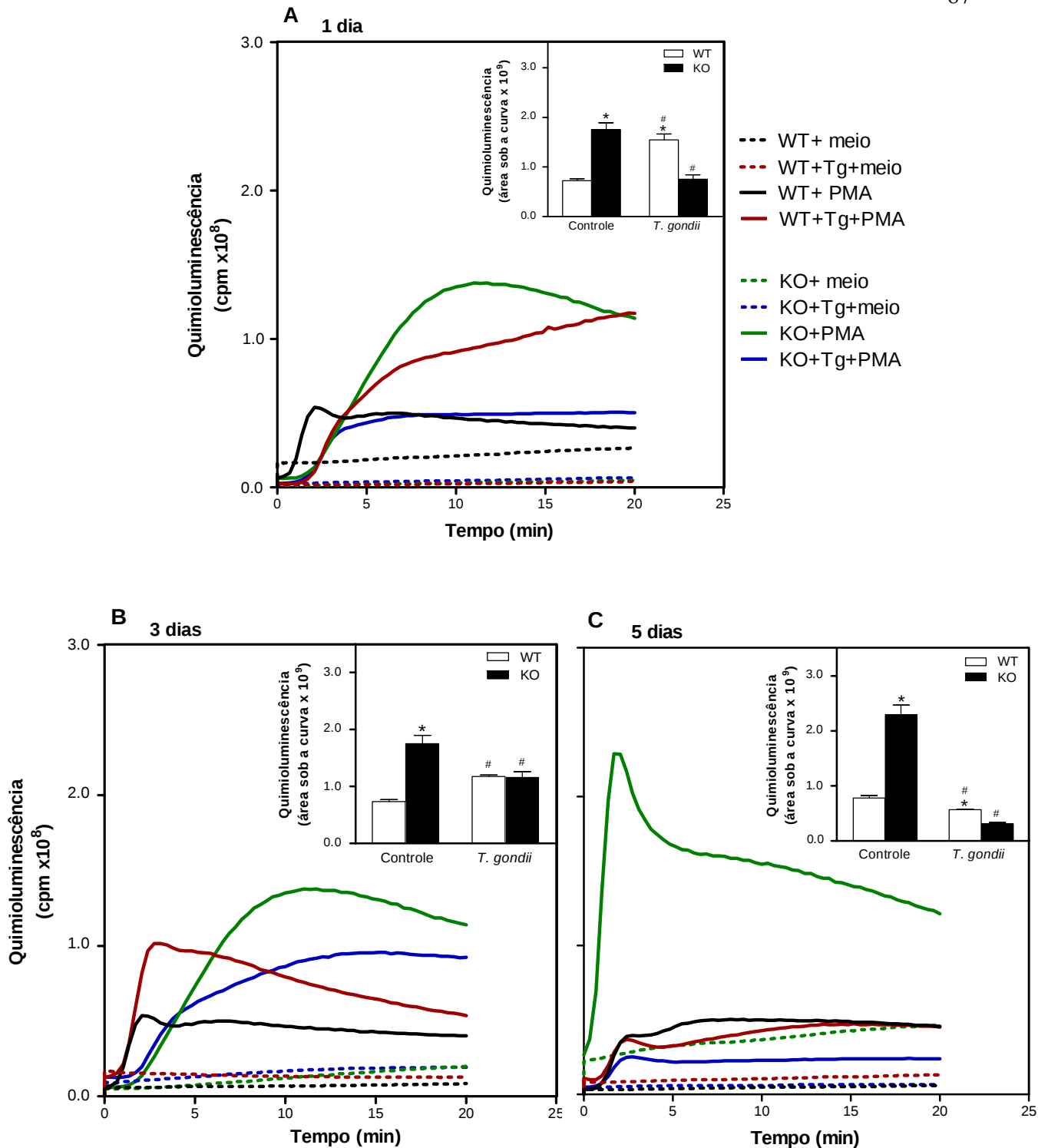


Figura 10. Ativação do metabolismo gerador de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após 1 (A), 3 (B) e 5 (C) dias de infecção com 1×10^2 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* ou PBS (controle). Neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram estimulados com PMA (10^{-7} M) e a liberação de ROS [quimioluminescência (QL)] foi medida em presença de 280 μ M de luminol (QLlum) durante 20 minutos. Controle da liberação espontânea foi realizado na ausência de PMA (meio: solução HBSS). Os dados estão expressos como perfis de QL produzida por neutrófilos e registrada em contagens por minuto (cpm). As linhas pontilhadas e as linhas contínuas representam, respectivamente, a liberação espontânea e estimulada por PMA de espécies reativas de oxigênio (ROS). As áreas integradas sob as curvas de QL, subtraindo a liberação espontânea, estão representadas nos insets (média $\pm$ SD). Estes resultados são representativos de três experimentos independentes em triplicata. * Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} para cada condição de tratamento; # Significância estatística em relação ao controle para cada genótipo de neutrófilos e tempo de infecção (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

4.2.4 Efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre exposição de fosfatidilserina em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

Para avaliar o efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre alterações apoptóticas em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e camundongos Gal-3^{-/-}, as células foram analisadas quanto à exposição de fosfatidilserina (PS) (marcação positiva para anexina-V) ou morte celular (marcação dupla para anexina-V e PI), após 30 minutos e 18 horas de infecção *in vitro* com taquizoítas de *T. gondii* comparado aos controles (Figura 11).

Após 30 minutos de infecção com *T. gondii*, foi observado significativo aumento na exposição de PS em neutrófilos Gal-3^{+/+} comparado ao controle e aos neutrófilos Gal-3^{-/-}, enquanto maior morte celular foi observada em neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado a Gal-3^{+/+} e ao controle ($p < 0,05$). Após 18 horas de cultura, foi observada exposição de PS significativamente diminuída em neutrófilos Gal-3^{+/+} comparado ao controle ($p < 0,05$). Ao contrário, exposição aumentada de PS e diminuição da morte celular foram observadas em neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado ao controle ($p < 0,05$). Nos grupos controles, foi observada maior exposição de PS em neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado a Gal-3^{+/+} somente após 30 minutos de cultura, enquanto morte celular significativamente aumentada em neutrófilos Gal-3^{-/-} e aumentada exposição de PS em neutrófilos Gal-3^{+/+} foram observadas após 18 horas de cultura ($p < 0,05$).

Como mostrado na Tabela 2, percentagem de alterações entre 30 minutos e 18 horas de cultura nos parâmetros de exposição de PS e morte celular mostraram que a infecção por *T. gondii* foi capaz de diminuir ambos, a exposição natural de PS e morte celular, em neutrófilos Gal-3^{+/+}. Entretanto, em neutrófilos Gal-3^{-/-} a infecção por *T. gondii* aumentou marcadamente a exposição de PS, com consequente diminuição na marcação para morte celular. Estes achados sugerem que a infecção por *T. gondii* diminui alterações apoptóticas precoces

avaliadas por exposição de PS e consequente morte celular em neutrófilos Gal-3^{+/+}, enquanto neutrófilos Gal-3^{-/-} apresentaram aumentada exposição de PS.

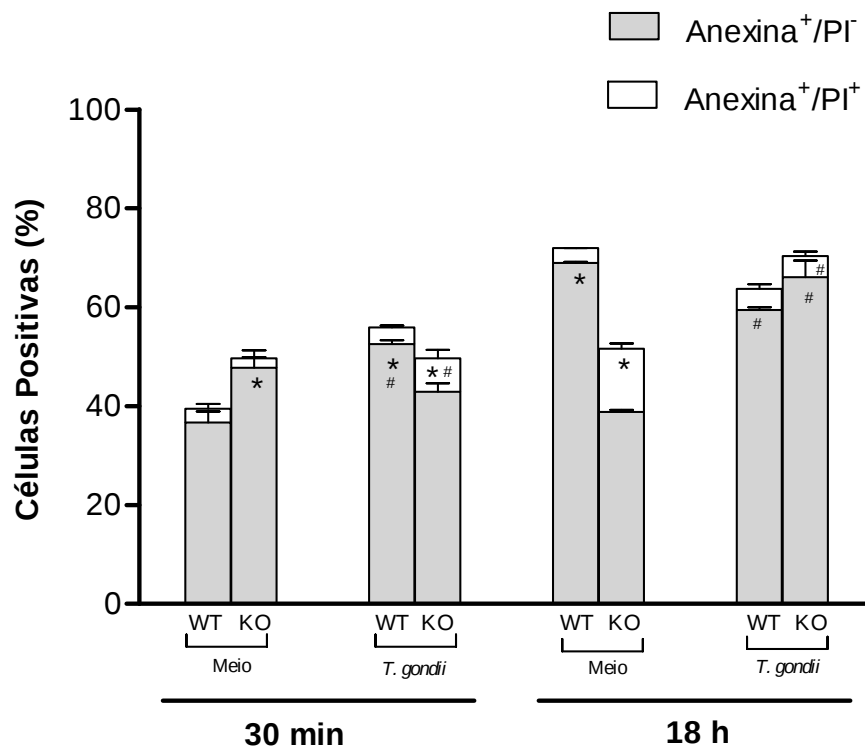


Figura 11. Análise da exposição de fosfatidilserina (PS) e morte celular usando marcação com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO), após infecção *in vitro* com a cepa RH de *T. gondii* (5 taquizoítas:1 célula) ou meio RPMI (controle). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (5x10⁵ células/100 µL/poço) a 37 °C e 5% de CO₂, coletados após 30 minutos ou 18 horas de cultura e analisados por citometria de fluxo para a exposição de PS por ligação a anexina-V e exclusão de PI (Anexina V⁺/PI⁻) e morte celular por ligação a ambos anexina-V e PI (anexina V⁺/PI⁺). Dados estão expressos como média ± SD e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. * Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} em cada condição de tratamento; # Significância estatística em relação ao meio em cada genótipo de neutrófilos e tempo de infecção (teste t de Student, p < 0,05).

Tabela 2. Análises de exposição de fosfatidilserina e morte celular usando marcação com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após infecção *in vitro* com a cepa RH de *T. gondii* (5 taquizoítas:1 célula) ou controle da infecção (meio RPMI).

Tratamento	Neutrófilos (%)			
	Gal-3 ^{+/+}		Gal-3 ^{-/-}	
	30 min	18 h	30 min	18 h
Meio (Controle)				
Anexina-V ⁻ / PI ⁻ (percentagem de alteração)	61.36 ± 2.13* (- 54.7%)	27.80 ± 0.52	49.49 ± 3.60 (- 2.2%)	48.39 ± 1.52
Anexina-V ⁺ / PI ⁻ (percentagem de alteração)	36.70 ± 2.23 (+ 87.8%)	68.92 ± 0.25*	47.78 ± 3.50* (- 18.7%)	38.83 ± 0.41
Anexina-V ⁺ / PI ⁺ (percentagem de alteração)	1.93 ± 0.22 (+ 55.9%)	3.01 ± 0.04*	2.71 ± 1.01 (+ 370%)	12.75 ± 1.11*
<i>T. gondii</i> (5 taquizoítas:1célula)				
Anexina-V ⁻ / PI ⁻ (percentagem de alteração)	39.37 ± 0.55* (- 8.1%)	36.18 ± 0.38	50.28 ± 2.56* (- 40.4%)	29.95 ± 3.49
Anexina-V ⁺ / PI ⁻ (percentagem de alteração)	52.54 ± 0.76 (+ 13.2%)	59.49 ± 0.55*	42.95 ± 1.67 (+ 53.9%)	66.12 ± 3.32*
Anexina-V ⁺ / PI ⁺ (percentagem de alteração)	3.38 ± 0.37 (+ 23.7%)	4.18 ± 0.91	6.73 ± 1.67 (- 4.2%)	3.89 ± 0.12

Dados estão expressos como média ± SD de percentagens celulares. Neutrófilos (5x10⁵ células/100 µL/poço) foram cultivados em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂ e coletados após 30 minutos ou 18 horas de cultura e analisados por citometria de fluxo. *Comparação entre tempos de estimulação (30 minutos e 18 horas) para cada condição de tratamento (teste *t* de Student, *p* < 0,05). Os dados são representativos de dois experimentos independentes em triplicata.

4.2.5 Efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre a viabilidade de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

Para confirmar a modulação diferencial da exposição de PS e morte celular em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e camundongos Gal-3^{-/-} induzida pela infecção *in vitro* por *T. gondii*, a viabilidade celular foi avaliada usando o método de conversão de MTT (Figura 12). Neutrófilos Gal-3^{+/+} mostraram maior viabilidade em 12, 18 e 24 horas após a infecção por *T. gondii* comparado aos controles ($p < 0,05$) (Figura 12A), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada entre neutrófilos Gal-3^{-/-} infectados e não-infectados (Figura 12B).

Na análise de grupos não-infectados, neutrófilos Gal-3^{-/-} exibiram viabilidade significativamente menor comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+} em 6 e 18 horas de cultura (Figura 12C), enquanto a comparação entre grupos infectados por *T. gondii* mostrou maior viabilidade celular para neutrófilos Gal-3^{+/+} até 24 horas após a infecção comparado a neutrófilos Gal-3^{-/-} ($p < 0,05$) (Figura 12D). Estes achados sugerem que a infecção por *T. gondii* retarda a morte celular em neutrófilos Gal-3^{+/+} quando comparada aos neutrófilos Gal-3^{-/-} que apresentaram menor viabilidade celular.

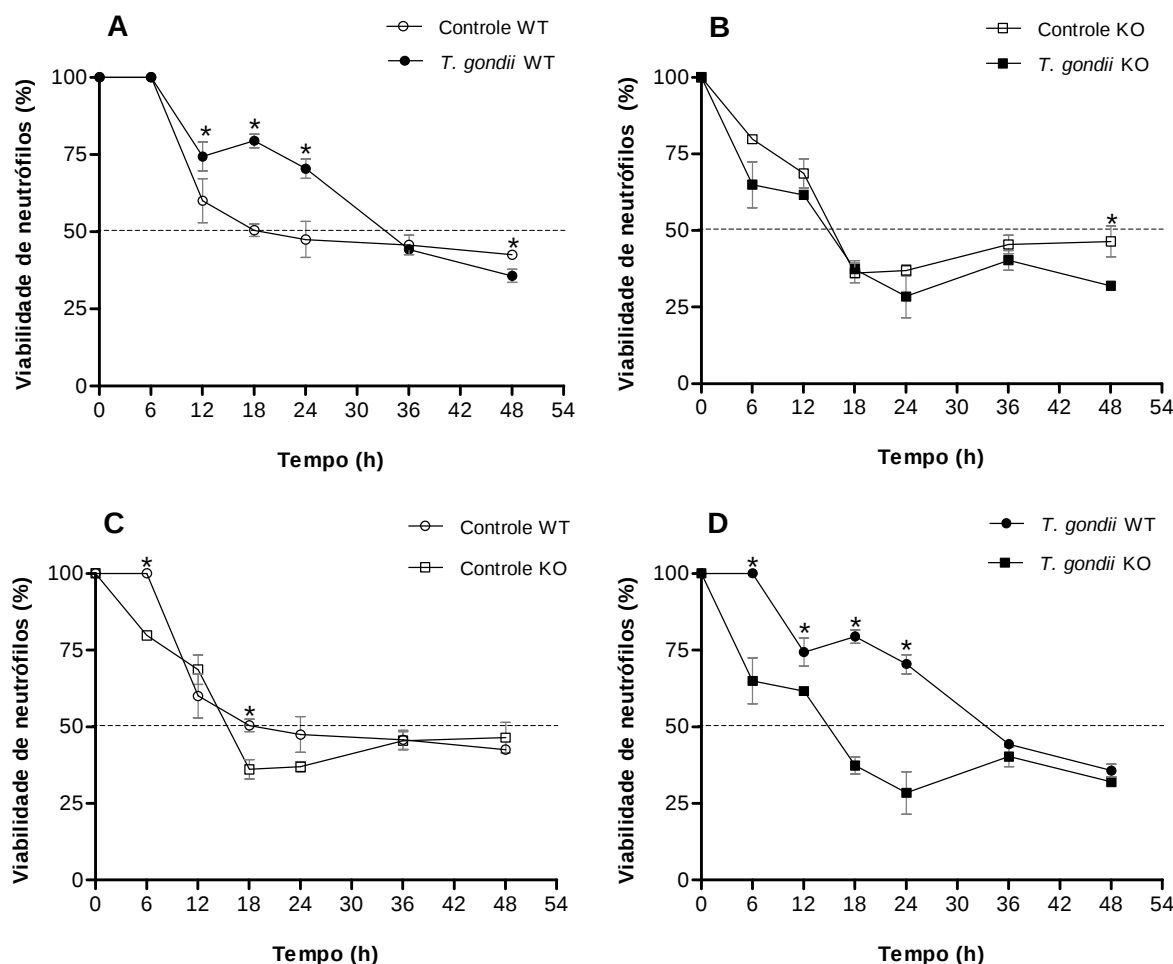


Figura 12. Viabilidade de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após infecção *in vitro* com a cepa RH de *T. gondii* (5 taquizoítas:1 célula) ou meio RPMI (controle). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (2x10⁵ células/100 µL/poço) a 37 °C e 5% de CO₂ e a viabilidade celular foi analisada usando o método de conversão de MTT, após diferentes tempos de cultura. Dados estão expressos como média ± SD e são representativos de três experimentos independentes em triplicata. *Comparação entre controle e *T. gondii* em neutrófilos Gal-3^{+/+} (A), controle e *T. gondii* em neutrófilos Gal-3^{-/-} (B), neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} nos grupos controles (C), neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} nos grupos infectados com *T. gondii* (D) (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

4.2.6 Toxicidade induzida pela infecção *in vitro* por *T. gondii* em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

A toxicidade induzida pela infecção *in vitro* de *T. gondii* em neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foi determinada pela atividade de LDH. Como mostrado na figura 13, os níveis de LDH foram significativamente aumentados em sobrenadantes de 18 horas de cultura de neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, independentemente de infecção, comparados aos níveis de LDH em sobrenadantes de 30 minutos de cultura. Entretanto, a infecção por *T. gondii* induziu maior liberação de LDH por ambos genótipos de neutrófilos em cultura comparado aos controles nos dois períodos de tempo analisados ($p < 0,05$). Além disto, a LDH liberada foi mais elevada em neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+} após infecção *in vitro* com *T. gondii*, bem como nos grupos não-infectados ($p < 0,05$). Estes dados indicam que a infecção por *T. gondii* induz maior toxicidade celular em neutrófilos Gal-3^{-/-} do que em neutrófilos Gal-3^{+/+}.

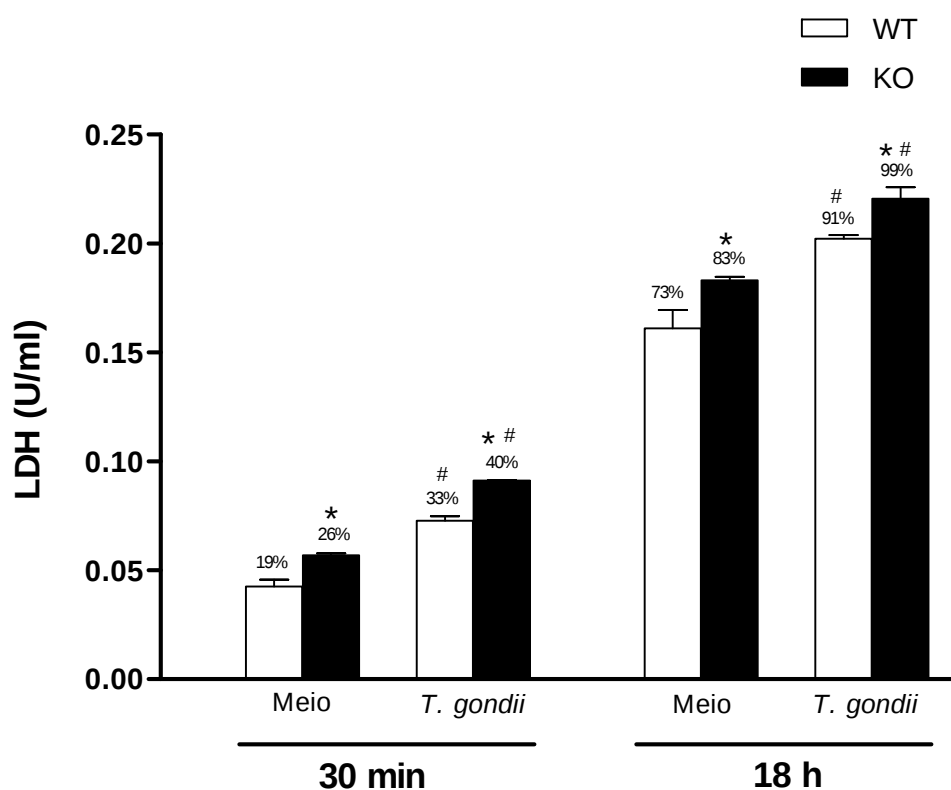


Figura 13. LDH liberada por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após infecção *in vitro* com *T. gondii* (5 taquizoítas:1 célula) ou meio RPMI (controle). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (5x10⁵ células/100 µL/poço) a 37 °C e 5% de CO₂ e os sobrenadantes foram coletados após 30 minutos ou 18 horas de cultura. A atividade LDH foi medida usando-se o kit LDH Liquiform e expressa em U/mL ou em quantidades relativas de LDH liberada em relação à lise completa de 5x10⁵ neutrófilos obtida com Triton X-100 a 0,2% (% do total). Dados estão expressos como média ± SD e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata.

* Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} em cada condição de tratamento;
 # Significância estatística em relação ao meio para cada genótipo de neutrófilos e tempo de infecção (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

4.2.7 Efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre a produção de citocinas por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

A produção de citocinas foi avaliada em sobrenadantes de cultura de neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} infectados ou não com *T. gondii* após 30 minutos e 18 horas de cultura (Figura 14). Os níveis de IL-10 foram significativamente aumentados em sobrenadantes de neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após 30 minutos de cultura, independente de infecção por *T. gondii*, com maiores níveis de IL-10 produzidos por neutrófilos Gal-3^{+/+} do que Gal-3^{-/-} (Figura 14A). Ao contrário, após 18 horas de cultura, a produção de IL-10 foi maior em neutrófilos Gal-3^{-/-}, independente da infecção ($p < 0,05$).

Os níveis de IL-6 foram aumentados em sobrenadantes de neutrófilos Gal-3^{-/-} infectados com *T. gondii* após 30 minutos de cultura, comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+} e em relação ao controle ($p < 0,05$). Em neutrófilos Gal-3^{+/+}, os níveis de IL-6 não foram dependentes da infecção (Figura 14B). Após 18 horas de cultura, entretanto, a produção de IL-6 foi maior em neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+}, independente da infecção, e também maior em neutrófilos Gal-3^{+/+} comparado ao controle ($p < 0,05$).

Por outro lado, os níveis de TNF- α foram significativamente elevados após 18 horas de cultura em ambos neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, independente da infecção, e também maior em neutrófilos Gal-3^{-/-} do que em Gal-3^{+/+} ($p < 0,05$) (Figura 14C). Níveis de IL-12, IFN- γ e IL-4 foram baixos e próximos ao limite de sensibilidade para os respectivos ensaios (Figuras 14D, 14E, 14F). Estes achados indicam que a produção de IL-10 e TNF- α por neutrófilos peritoneais inflamatórios foi dependente de Gal-3, mas não da infecção por *T. gondii*, com a presença de Gal-3 sendo relacionada à maior produção de IL-10 e sua ausência relacionada à maior produção de TNF- α . Por outro lado, a produção de IL-6 foi associada à infecção pelo parasito e ausência de Gal-3, já que maiores níveis de IL-6 foram produzidos por neutrófilos Gal-3^{-/-} infectados.

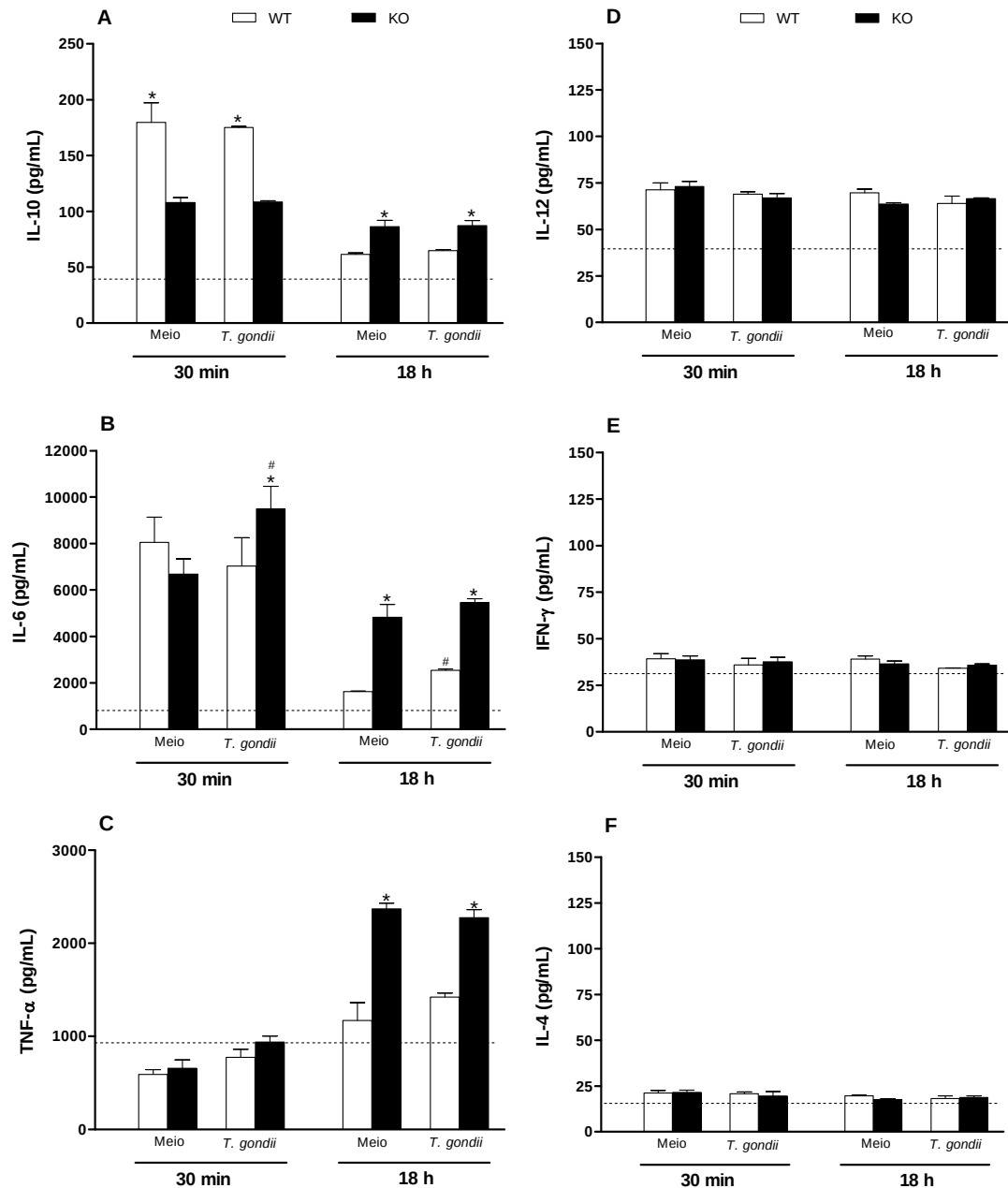


Figura 14. Produção de citocinas por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após infecção *in vitro* com *T. gondii* (5 taquizoítas:1 célula) ou meio RPMI (controle). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (1x10⁶ células/100 μL/poço) a 37 °C e 5% de CO₂ e os sobrenadantes livres de células foram coletados após 30 minutos ou 18 horas de cultura para quantificação de citocinas por ELISA. Dados são expressos como média ± SD e representativos de dois experimentos independentes em triplicata. As linhas pontilhadas indicam o limite de sensibilidade para cada ensaio. * Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} para cada condição de tratamento; # Significância estatística em relação ao meio para cada genótipo de neutrófilos e tempo de infecção (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

4.2.8 Efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre a desgranulação de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

Para avaliar se a infecção por *T. gondii* e galectina-3 influenciam na desgranulação de neutrófilos, a liberação de lisozima foi determinada em sobrenadantes de cultura de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e camundongos Gal-3^{-/-} após 30 minutos e 18 horas de cultura (Figura 15). Níveis de lisozima foram não detectáveis após 30 minutos de cultura em todas as condições experimentais. Após 18 horas de estimulação, maiores níveis de lisozima foram liberados por neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+}, independente da infecção ($p < 0,05$). Ao contrário, a infecção por *T. gondii* induziu maior liberação de lisozima por neutrófilos Gal-3^{+/+} comparado ao controle ($p < 0,05$). Estes dados indicam que maior desgranulação de neutrófilos ocorre na ausência de Gal-3, independente da infecção. Entretanto, na presença de Gal-3, a desgranulação ocorreu naturalmente, mas foi também dependente da infecção pelo parasito.

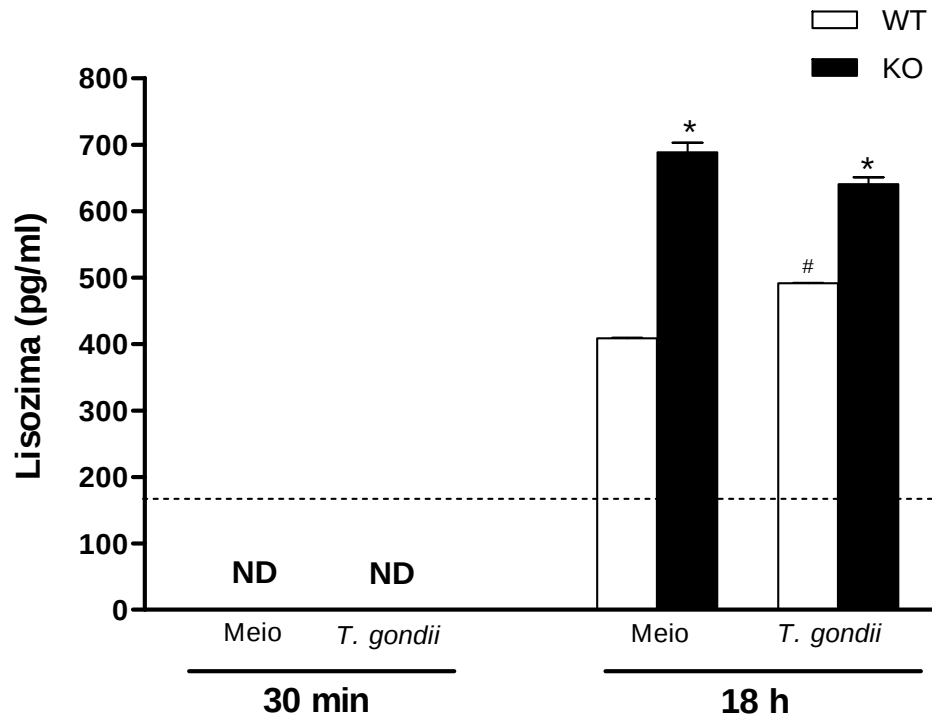


Figura 15. Lisozima liberada por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após infecção *in vitro* com *T. gondii* (5 taquizoítas:1 célula) ou meio RPMI (controle). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (5x10⁵ células/100 µL/poço) a 37 °C e 5% de CO₂ e os sobrenadantes foram coletados após 30 minutos ou 18 horas de cultura. A liberação de lisozima foi avaliada pela taxa de lise de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e expressa em pg/mL em relação à curva padrão. A linha pontilhada indica o limite de sensibilidade para o ensaio. ND, não-detectável. Dados estão expressos como média ± SD e são representativos de dois experimentos independentes em triplicata. * Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} para cada condição de tratamento; # Significância estatística em relação ao meio para cada genótipo de neutrófilos e tempo de infecção (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

4.2.9 Efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

Para verificar se infecção *in vitro* por *T. gondii* e galectina-3 interferem na geração de ROS por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, a ativação do metabolismo gerador de ROS induzida por PMA em neutrófilos foi avaliada por respostas de QLlum após 30 minutos e 18 horas de estimulação com parasitos sob diferentes condições (Figura 16). Após 30 minutos de estimulação com *T. gondii* ativo, ou inativado pelo calor, ou parasitos opsonizados com IgG anti-RH ou IgG irrelevante (Figura 16C), foi observada significativa diminuição das respostas de QLlum por neutrófilos Gal-3^{+/+} comparado ao controle ($p < 0,05$). Ao contrário, neutrófilos Gal-3^{-/-} produziram maior resposta de QLlum comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+} ($p < 0,05$), mas não comparado ao controle. Após 18 horas de estimulação, as respostas de QLlum diminuíram significativamente em todas as condições experimentais em ambas as linhagens de neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, comparado aos valores de QLlum obtidos após 30 minutos de cultura (diminuição de aproximadamente 7 vezes). Desta maneira, não foi possível avaliar com precisão quaisquer alterações na geração de ROS em neutrófilos após este período de cultura por QLlum (dados não mostrados). Além disso, a estimulação por *T. gondii* *in vitro* não alterou a liberação espontânea (na ausência de PMA) de ROS comparado aos controles em ambos os genótipos de células (Figuras 16A e 16B). Estes resultados sugerem que Gal-3 modula negativamente a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios na ausência da estimulação com *T. gondii* e também está envolvida na diminuição da geração de ROS induzida por *T. gondii* nas diferentes condições de tratamento..

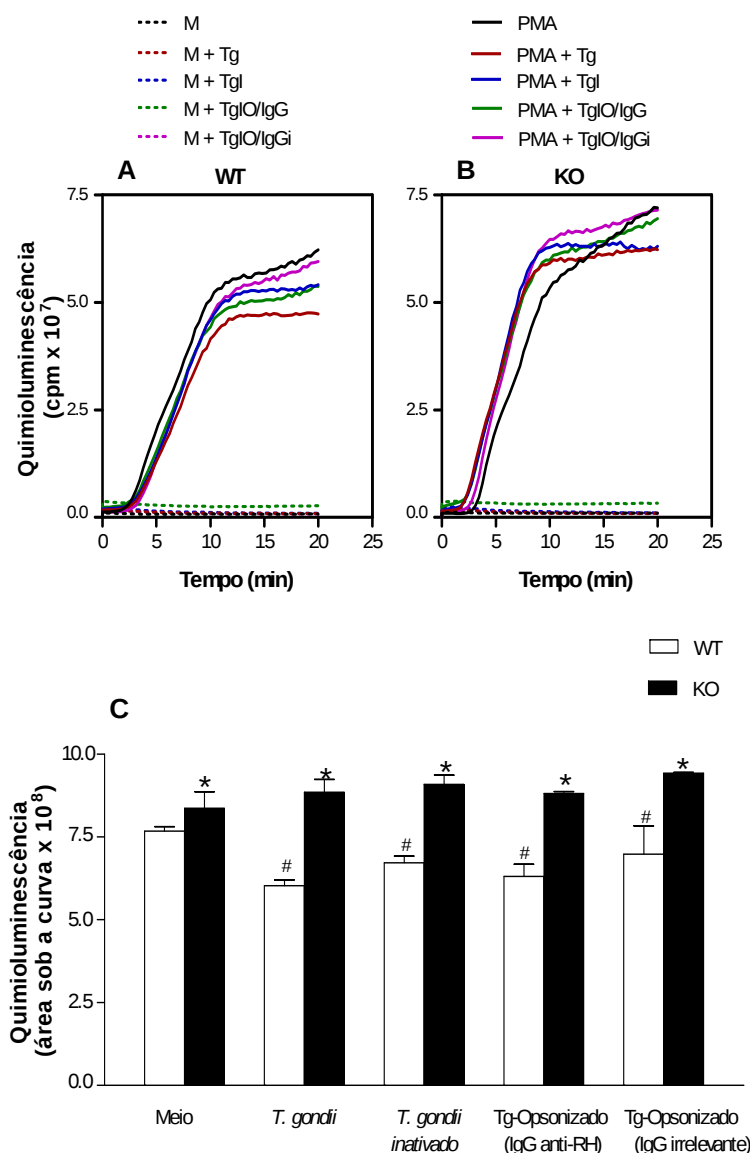


Figura 16. Ativação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após estimulação *in vitro* com *T. gondii* sob diferentes tratamentos (5 taquizoítas:1 célula) ou meio RPMI (controle). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (5x10⁵ células/100 µL/poço) a 37 °C e 5% de CO₂ e estimulados com *T. gondii* ativo (Tg), taquizoítas inativados pelo calor (TgI), taquizoítas inativados e opsonizados por IgG-anti RH (TgIO/IgG), taquizoítas inativados e opsonizados por IgG irrelevante (TgIO/IgGi) ou meio RPMI por 30 minutos. As células foram estimuladas com PMA (10⁻⁷M) e a liberação de ROS foi medida por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) por 20 minutos. A liberação espontânea de ROS foi medida na ausência de PMA (M: solução HBSS). **(A, B)** Perfis de QLlum expressos como unidades de quimioluminescência em contagens por minuto (cpm). As linhas pontilhadas e as linhas contínuas representam, respectivamente, a liberação espontânea e estimulada por PMA de ROS. **(C)** Área integrada sob as curvas dos perfis de QLlum (média ± SD), subtraindo a liberação espontânea. * Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} para cada condição de tratamento; # Significância estatística em relação ao controle para cada genótipo de neutrófilos (teste t de Student, p < 0,05).

4.2.10 Efeito da infecção *in vitro* por *T. gondii* sobre a geração de ROS induzida por zimosan em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

Para analisar se a infecção *in vitro* por *T. gondii* e galectina-3 poderiam interferir com a ativação do metabolismo gerador de ROS em neutrófilos induzida por estímulos dependentes de interação com receptores de membrana na célula hospedeira, a produção de ROS por neutrófilos de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} induzida por zimosan foi avaliada por QLlum após 30 minutos de estimulação com parasitos sob diferentes condições (Figura 17). Os resultados mostraram que a estimulação de neutrófilos Gal-3^{+/+} ou Gal-3^{-/-} por *T. gondii* ativo (Tg) ou inativado e opsonizado com IgG anti-RH (TgIO/IgG) diminuiu significativamente as respostas de QLlum induzidas por zimosan nas diferentes concentrações usadas, comparado aos controles ($p < 0,05$) (Figura 17C). Entretanto, para ambos os genótipos de neutrófilos, não houve diferença significativa entre as respostas de QLlum induzidas por diferentes concentrações de zimosan nos grupos estimulados com *T. gondii* ativo (Tg) ou inativado e opsonizado com IgG anti-RH (TgIO/IgG) e nos grupos controles. Em todas as condições experimentais, as respostas de QLlum de neutrófilos Gal-3^{-/-} estimulados com zimosan foram significativamente maiores comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+} ($p < 0,05$). Além disto, a estimulação com parasitos ativos ou inativados/opsonizados não alterou a liberação espontânea de ROS comparado aos controles em ambos os genótipos de células (Figuras 17A e 17B). Estes resultados sugerem que Gal-3 modula negativamente a geração de ROS induzida por zimosan em neutrófilos peritoneais inflamatórios, independente da estimulação por *T. gondii*, uma vez que em todas as condições experimentais a geração de ROS foi menor em presença de Gal-3. Entretanto, após estimulação com *T. gondii*, a geração de ROS estimulada por zimosan foi significativamente inibida de maneira independente de Gal-3, ou seja, em presença e na ausência de Gal-3.

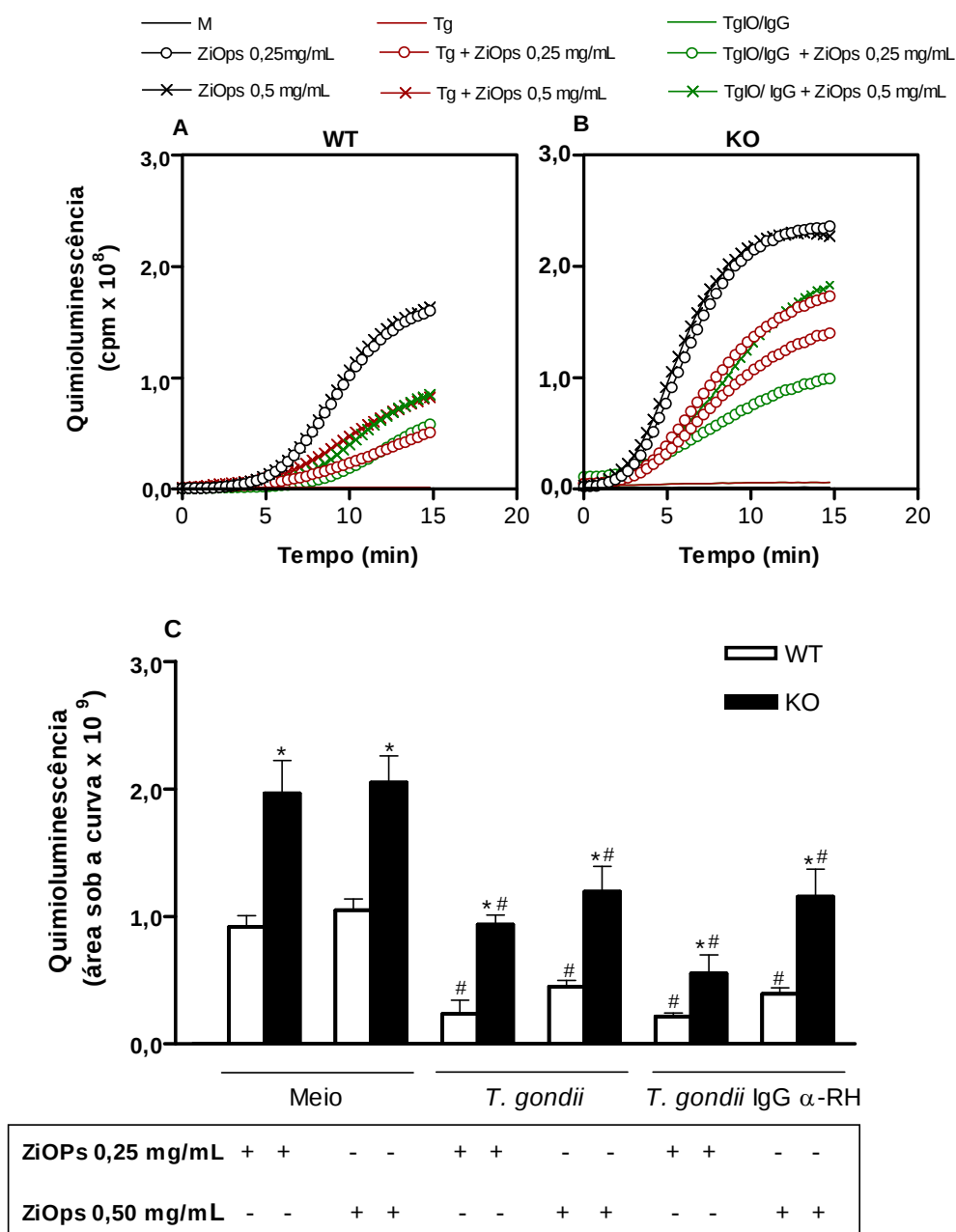


Figura 17. Ativação do metabolismo gerador de ROS induzida por zimosan em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após estimulação *in vitro* com *T. gondii* (5 taquizoítas:1 célula) sob diferentes tratamentos ou meio RPMI (controle). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (5x10⁵ células/100 μ L/poço) a 37 °C e 5% de CO₂ e estimulados com taquizoítas de *T. gondii* ativo (Tg), taquizoítas inativados e opsonizados por IgG-anti RH (TgIO/IgG) ou meio RPMI (M: controle) por 30 minutos. As células foram estimuladas com zimosan opsonizado com soro humano normal (ZiOps) (0,25 ou 0,50 mg/mL) e a liberação de ROS foi medida por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) por 20 minutos. A liberação espontânea de ROS foi medida na ausência de zimosan [M (—), Tg (—), TgIO/IgG (—)]. **(A, B)** Perfis de QLlum expressos como unidades de quimioluminescência em contagens por minuto (cpm). **(C)** Área integrada sob as curvas dos perfis de QLlum (média $\pm$ SD), subtraindo a liberação espontânea. * Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} para cada condição de tratamento; # Significância estatística em relação ao controle para cada genótipo de neutrófilos (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

4.2.11 Efeito da estimulação *in vitro* por antígeno solúvel de *T. gondii* sobre a geração de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}

Para verificar se o antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) poderia induzir alterações funcionais em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-}, o metabolismo gerador de ROS induzido por PMA em neutrófilos foi medido por QLlum após 30 minutos de estimulação com o antígeno (Figura 18). Após estimulação com STAg (Figura 18C), foi observada significativa diminuição das respostas de QLlum por neutrófilos Gal-3^{+/+} comparado aos neutrófilos Gal-3^{-/-} para todas as concentrações de antígeno ($p < 0,05$). Além disso, na maior concentração de STAg (100 $\mu\text{g/mL}$), as respostas de QLlum por neutrófilos Gal-3^{+/+} foram significativamente menores em relação às células não-estimuladas (controle) ($p < 0,05$) (Figura 18C). Também, a estimulação por STAg *in vitro* não alterou a liberação espontânea de ROS comparado aos controles em ambos os genótipos de células (Figuras 18A e 18B).

Estes resultados demonstram que o STAg em alta concentração parece modular a geração de ROS por neutrófilos peritoneais inflamatórios de maneira dependente de Gal-3.

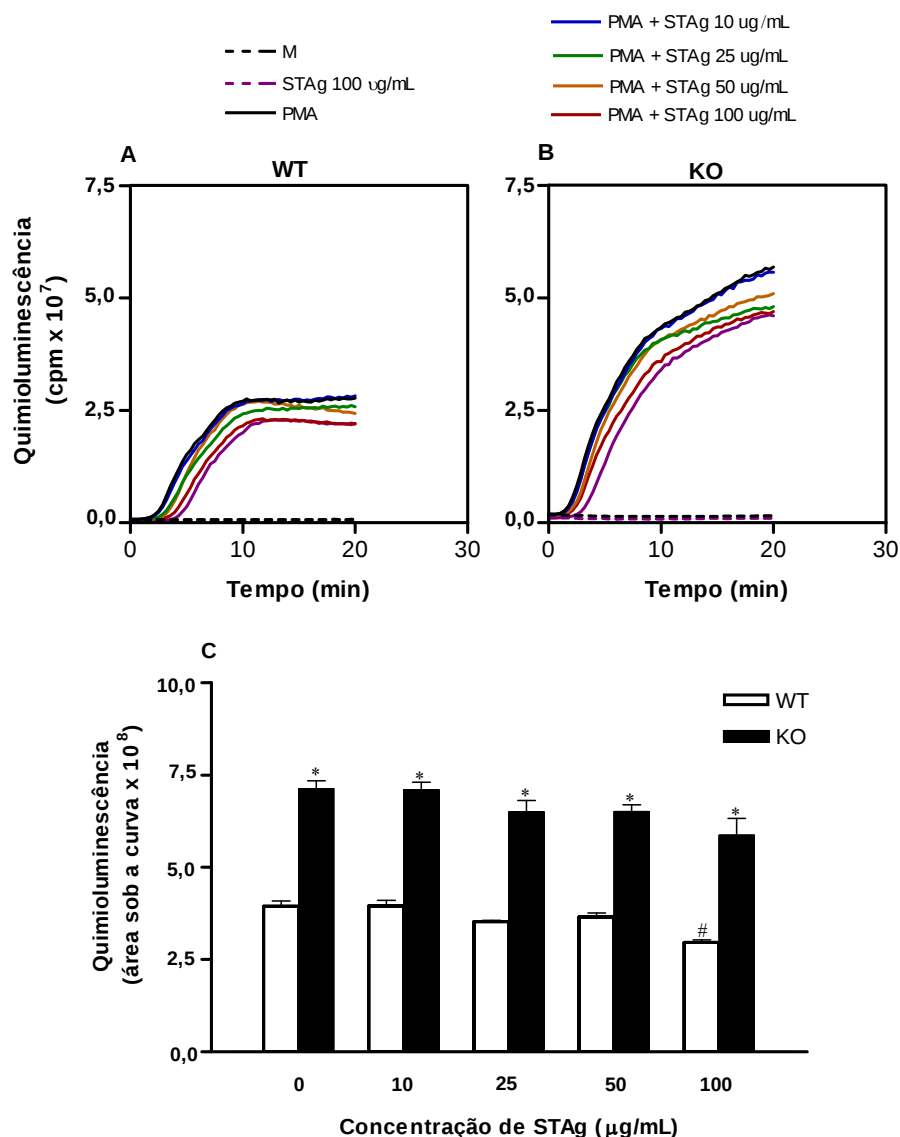


Figura 18. Ativação do metabolismo gerador de ROS induzida por PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} (WT) e Gal-3^{-/-} (KO) após estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg). Neutrófilos foram cultivados em placas de 96 poços (5x10⁵ células/100 μL/poço) a 37 °C e 5% de CO₂ e estimulados com diferentes concentrações de STAg (25, 50 e 100 μg/mL) ou meio RPMI (controle) por 30 minutos. As células foram estimuladas com PMA (10⁻⁷M) e a liberação de ROS foi medida por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) por 20 minutos. A liberação espontânea de ROS foi medida na ausência de PMA. **(A, B)** Perfis de QLlum expressos como unidades de quimioluminescência em contagens por minuto (cpm). As linhas pontilhadas e as linhas contínuas representam, respectivamente, a liberação espontânea e estimulada por PMA de ROS. **(C)** Área integrada sob as curvas dos perfis de QLlum (média ± SD), subtraindo a liberação espontânea. * Comparação entre neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} para cada concentração de antígeno; # Significância estatística em relação ao controle (ausência de antígeno) para cada genótipo de neutrófilos (teste *t* de Student, *p* < 0,05).

5 DISCUSSÃO

A interação entre patógenos intracelulares e células do organismo leva à ativação de vários mecanismos de defesa no hospedeiro e no parasito a fim de garantir a sobrevivência de cada um destes. No organismo hospedeiro diferentes mecanismos imunes predominam em cada estágio de infecção. Ambas, células fagocíticas e não-fagocíticas participam no *clearance* e destruição intracelular do microrganismo. Além disto, o desenvolvimento de imunidade específica assegura ativação sustentada de mecanismos microbicidas intracelulares nas células-alvo e indução de morte celular por apoptose ou lise mediada por linfócitos T citotóxicos. Por outro lado, o patógeno também exibe diferentes estratégias de evasão, as quais são empregadas em contraposição às defesas do hospedeiro (ISMAIL et al., 2002).

O protozoário *T. gondii* é um potente estímulo ativador da resposta imune inata pró-inflamatória e da resposta imune adaptativa mediada por células associada a citocinas do tipo Th1. Em contraposição a estas potentes atividades pró-inflamatórias, *T. gondii* dispõe de vários mecanismos para modular a resposta imune. De maneira geral, a resposta imune à infecção por *T. gondii* caracteriza-se por um delicado balanço entre a resposta imune do hospedeiro, a qual é elaborada para eliminar o microrganismo, e as estratégias para evasão do sistema imune ou imunomodulação elicitadas pelo parasito. Em conjunto, estes mecanismos visam a sobrevivência de ambos o parasito e o hospedeiro (MILLER et al., 2009).

A imunidade inata a *T. gondii* envolve interações entre vários tipos celulares, incluindo os neutrófilos que são importantes em mediar o início da resposta imune contra infecção pelo parasito (BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000; DEL RIO et al., 2001; BLISS et al., 2001; BENNOUNA et al., 2003; 2005; MILLER et al., 2009). Por outro lado, a ampla distribuição da galectina-3 em várias células do sistema imune e as suas múltiplas funções, incluindo adesão de neutrófilos na matriz extracelular, quimioatração para células fagocitárias, ativação

do metabolismo gerador de ROS em neutrófilos, produção de quimiocinas, bem como atividades anti- e pró-apoptóticas, apontam a galectina-3 como importante molécula imunomoduladora (LIU; HSU, 2007). Contudo, pouco é conhecido sobre o papel desta lectina na resposta imune a *T. gondii* e não há relatos sobre a interação entre esse parasito, galectina-3 e neutrófilos.

No presente trabalho, nós estabelecemos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* utilizando camundongos C57BL/6 selvagens (Gal-3^{+/+}) e deficientes em galectina-3 (Gal-3^{-/-}) para avaliar o papel da galectina-3 em diferentes funções de neutrófilos durante a infecção por *T. gondii*.

Inicialmente, nós avaliamos o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após estímulo com tioglicolato. Nossos resultados mostraram que ambas as linhagens de camundongos foram capazes de exibir resposta inflamatória ao tioglicolato. Entretanto, a resposta inflamatória peritoneal foi reduzida na ausência de galectina-3, uma vez que as concentrações de leucócitos, bem como de neutrófilos, recrutados para a cavidade peritoneal foram significativamente menores, comparadas aos camundongos Gal-3^{+/+} (Figura 8A). Estes dados sugerem que galectina-3 endógena pode estar associada a mecanismos reguladores de processos inflamatórios peritoneais. Em ambos os camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} o pico do influxo de neutrófilos ocorreu após 6 horas da injeção de tioglicolato (Figura 8A). Este dado foi importante para determinarmos o intervalo de tempo mais adequado para a coleta de exsudatos peritoneais ricos em neutrófilos, células estas que seriam posteriormente isoladas e utilizadas nos ensaios para avaliação das funções de neutrófilos.

Níveis diminuídos de inflamação peritoneal em camundongos Gal-3^{-/-} também foram descritos por Hsu e cols. (2000). Estes autores mostraram que após 1, 3 e 6 dias de injeção intraperitoneal com tioglicolato, camundongos Gal-3^{-/-} exibiram níveis diminuídos de

inflamação peritoneal, como observado pelo menor número de leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal. Além disto, foi demonstrado também que, na ausência de galecina-3, as porcentagens de monócitos/macrófagos e de neutrófilos foram significativamente menores, comparadas aos animais Gal-3^{+/+}, após 1 dia, mas não após 2 e 4 dias, de estimulação com tioglicolato.

Em paralelo ao estímulo com tioglicolato, nós avaliamos o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após infecção intraperitoneal com a cepa virulenta RH de *T. gondii*. Ao contrário do que foi observado quando tioglicolato foi usado como estímulo, nenhuma diferença significativa foi observada no recrutamento de neutrófilos após infecção por *T. gondii* entre camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (Figura 8B). Em todos os períodos de tempo analisados, a população de linfócitos foi predominante, independente da infecção e da presença de galectina-3. Entretanto, houve um rápido influxo de neutrófilos, em ambas as linhagens de camundongos, após 3 horas de infecção comparativamente ao grupo controle que induziu um pico mais tardio (6 horas) de influxo de neutrófilos (Figura 8B). Estes resultados refletem a capacidade dos neutrófilos para rapidamente responderem a um estímulo inflamatório potente como *T. gondii*. Outros autores também demonstraram um significativo influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 ou BAL/c, após 4 horas de infecção com 2×10^6 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000; DEL RIO, 2001). Vale ressaltar que o inóculo de parasitos usado em nosso modelo de infecção (1×10^2 taquizoítas) consistiu de carga parasitária 20.000 vezes menor. Com relação ao papel da galectina-3 no recrutamento de neutrófilos induzido por *T. gondii*, nossos resultados mostraram que esta lectina não modulou a inflamação peritoneal neste modelo de infecção e períodos de tempo analisados, provavelmente porque a infecção pela cepa RH virulenta de *T. gondii* provoca forte resposta inflamatória inicialmente mediada por neutrófilos.

Para verificar o papel da galectina-3 na infecção *in vivo* por cepa virulenta de *T. gondii*, camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foram infectados intraperitonealmente com 1×10^2 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Novamente, nós demonstramos que galectina-3 não mostrou qualquer efeito sobre as curvas de sobrevivência e escores médios de morbidade dos camundongos após infecção com esta cepa virulenta (Figura 9). Comparando os presentes achados com resultados prévios (BERNARDES et al., 2006), demonstrando que a mortalidade e morbidade de camundongos Gal-3^{-/-} foi comparável com aquela de camundongos Gal-3^{+/+} quando infectados oralmente, mas maior quando infectados intraperitonealmente com a cepa avirulenta ME-49 de *T. gondii*, pode-se afirmar que o grau de virulência da cepa, bem como a via de inoculação, são importantes aspectos a serem considerados no desenvolvimento da infecção, como tem sido recentemente relatado (GIGLEY; FOX; BZIK, 2009). Neste contexto, as vias de sinalização para estabelecer uma resposta inata efetiva a *T. gondii* levando, por exemplo, a produção de IL-12, são fortemente influenciadas pelo genótipo do parasito, com as cepas avirulentas, tais como ME-49 ativando ambas as vias MyD88-dependentes e MyD88 independentes, enquanto cepas virulentas tais como RH estimulam apenas vias independentes de MyD88 (KIM et al., 2006; MILLER et al., 2009). Também é bem conhecido há vários anos que cepas avirulentas induzem produção de maiores quantidades de IL-12 do que cepas virulentas de *T. gondii* (ROBBEN et al., 2004) e a estimulação de duas vias distintas levando à produção de IL-12 por cepas avirulentas *versus* uma única via estimulada por cepas virulentas de *T. gondii* poderia, pelo menos em parte, explicar os fenômenos observados acima, uma vez que a produção de IFN- γ dependente de IL-12 é vital para a resistência do hospedeiro à infecção (DENKERS et al., 2004).

Embora tenha sido relatado que galectina-3 exógena ativa a NADPH-oxidase em neutrófilos primados (YAMAOKA et al., 1995; KARLSSON et al., 1998; FERNÁNDEZ et al., 2005), os efeitos da galectina-3 endógena nos mecanismos efetores centrais durante um

processo inflamatório, incluindo fagocitose, exocitose do conteúdo dos grânulos (desgranulação) e tempo médio de vida, ainda não estão bem caracterizados. No presente trabalho, nós avaliamos o metabolismo gerador de ROS em neutrófilos recrutados para a cavidade peritoneal de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} após infecção *in vivo* com a cepa virulenta RH de *T. gondii*.

Primeiro, nós observamos que na ausência de infecção, a ativação do metabolismo gerador de ROS induzida por PMA foi maior em neutrófilos Gal-3^{-/-} comparado a neutrófilos Gal-3^{+/+}. Entretanto, em neutrófilos peritoneais inflamatórios obtidos de animais infectados, a estimulação *in vitro* das células com PMA mostrou que neutrófilos Gal-3^{-/-} foram menos responsivos à geração de ROS em todos os períodos de infecção analisados, enquanto neutrófilos Gal-3^{+/+} mostraram aumento no metabolismo gerador de ROS de maneira tempo-dependente, ou seja, no início da infecção (1 e 3 dias) houve um significativo aumento na produção de ROS seguido de declínio após 5 dias de infecção (Figura 10). Estes achados sugerem que apesar de neutrófilos Gal-3^{-/-} apresentarem maior geração de ROS em resposta ao PMA, na ausência de infecção por *T. gondii*, isto não significa maior eficiência no desempenho de suas funções efetoras microbicidas, uma vez que sob condição da infecção, estas células reduziram significativamente seu metabolismo gerador de ROS. Por outro lado, neutrófilos Gal-3^{+/+} mostraram ser mais responsivos à geração de ROS sob estímulo de PMA na presença da infecção por *T. gondii*, indicando que a galectina-3 endógena possa exercer papel modulador nesta função dos neutrófilos frente à infecção pelo parasito. Além disso, o declínio observado para esta função após 5 dias de infecção pode estar relacionado ao quadro clínico apresentado pelos animais neste período de tempo, como demonstrado pelas curvas de morbidade e mortalidade que se acentuam nesta fase da infecção (Figura 9).

Outro aspecto a ser considerado é a associação entre a geração de ROS em neutrófilos e apoptose. Em condições fisiológicas normais, após a maturação e liberação a partir da medula

óssea, os neutrófilos têm uma média de vida em circulação de 6 a 8 horas e morrem rapidamente por apoptose (HASLETT, 1997). Este mecanismo de morte tem sido bem caracterizado e inclui ativação de caspases, exposição de fosfatidilserina (PS) e fagocitose por macrófagos (SAVILL et al., 1989; FADOK et al., 1992; FADEEL et al., 1998). De fato, foi demonstrado na literatura que neutrófilos murinos aumentaram em três vezes a exposição de PS após a fagocitose de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, neutrófilos isolados a partir de camundongos deficientes no gene para a proteína gp91^{phox} (gp91^{phox-/-}) e que possuem, portanto, a enzima NADPH-oxidase funcionalmente deficiente (modelo murino de doença granulomatosa crônica) não expressaram PS após a fagocitose de *S. aureus*, confirmando a importância de NADPH-oxidase funcional para a externalização de PS. Paralelamente, neutrófilos dos camundongos selvagens foram eficientemente fagocitados por macrófagos, sendo que este fenômeno foi inibido por DPI (iodônio difenileno: inibidor de NADPH-oxidase), enquanto o mesmo efeito não foi observado para neutrófilos gp91^{phox-/-}. Considerando estes resultados, os autores concluíram que os agentes oxidantes produzidos por neutrófilos fagocíticos devido à ativação de NADPH-oxidase provocam mudanças na superfície celular, resultando no reconhecimento e engolfamento destas células por macrófagos (WILKIE et al., 2007).

Diante dos dados expostos, pode-se especular que neutrófilos Gal-3^{-/-} ao exibirem maior metabolismo gerador de ROS induzido por PMA na ausência de infecção, poderiam já estar fisiologicamente mais ativados (primados) e produzirem ROS, apresentando maior susceptibilidade à morte apoptótica. Isto poderia, então, explicar o menor recrutamento de neutrófilos na cavidade peritoneal dos camundongos Gal-3^{-/-}, como observado anteriormente neste estudo, e enfatizar o papel da galectina-3 como uma molécula associada à modulação do metabolismo gerador de ROS em neutrófilos, como já descrito por outros autores (FERNÁNDEZ et al., 2005).

Evidências acumuladas na literatura têm estabelecido que a ativação de várias células, incluindo neutrófilos, é dependente de vias intracelulares alternativas. Existem relatos na literatura sugerindo galectina-3 como um mediador fisiológico presente em sítios inflamatórios que ativa diferentes componentes da via MAPK e poderia estar atuando em conjunto para modular a funcionalidade e longevidade de neutrófilos (FERNÁNDEZ et al., 2005; MILLER et al., 2009). A via MAPK é também importante nas respostas de neutrófilos a *T. gondii*. A ativação desta via é iniciada pela interação entre receptores *Toll like* (TLRs) e estruturas específicas na superfície do patógeno (PAMPS: padrões moleculares associados a patógenos), com resultante ativação de vários fatores de transcrição de genes que codificam, por exemplo, a expressão de citocinas, tais como IL-12 e TNF- α (DENKERS et al., 2004). Uma vez que galectina-3 está relacionada à ativação de componentes da via MAPK, como descrito acima, a modulação da ativação e sobrevivência de neutrófilos irá depender do balanço de sinais intracelulares desencadeados por vários agentes, incluindo patógenos, e galectina-3 pode estar envolvida nesses eventos.

Neste sentido, nós investigamos no presente estudo se o estímulo *T. gondii* é capaz de modular a vida média de neutrófilos e se galectina-3 está envolvida neste processo. Nossos resultados demonstraram que infecção por *T. gondii in vitro* modula a exposição de PS e morte celular diferentemente em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (Figuras 11 e 12). Baseado nas porcentagens de variações na exposição de PS e morte celular de neutrófilos entre 30 minutos e 18 horas de cultura (Tabela 2), nós encontramos que a infecção por *T. gondii* levou a um considerável decréscimo de ambas, exposição de PS e morte celular, em neutrófilos Gal-3^{+/+}. Entretanto, em neutrófilos Gal-3^{-/-}, a infecção por *T. gondii* marcadamente aumentou a exposição de PS. Esta modulação diferencial da exposição precoce de PS e morte celular em neutrófilos peritoneais

inflamatórios de camundongos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foi também confirmada por determinação da viabilidade celular pelo método de conversão de MTT.

A modulação da apoptose espontânea de neutrófilos está bem descrita por vários autores. A exposição de neutrófilos a citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-15, IL-8, G-CSF, GM-CSF ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) retarda o processo de apoptose, sugerindo que neutrófilos podem ter seu tempo de vida prolongado, particularmente durante um processo infeccioso (BRACH et al., 1992; COLOTTA et al., 1992; KETTRITZ et al., 1998; WILKIE et al., 2007).

Neutrófilos apoptóticos exibem alterações morfológicas características, bem como alterações na membrana citoplasmática que resultam da expressão diminuída de alguns receptores e apresentação de novas moléculas na superfície celular. Fosfatidilserina, um marcador de células apoptóticas, é expressa na superfície de neutrófilos apoptóticos em consequência de alterações na simetria de fosfolípidos de membrana (HOMBURG et al., 1995). Por outro lado, alguns autores têm mostrado que a exposição de PS pode não ser seguida de apoptose em alguns tipos de células (STOWELL et al., 2008).

Neste contexto, a indução ou inibição da apoptose de células hospedeiras por protozoários tem sido bastante investigada (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; GAVRILESCU et al., 2003; CARMEN; SINAI, 2007; LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008). Channon e cols. (2002) mostraram que neutrófilos incubados com taquizoítas da cepa PLK de *T. gondii* derivados de fibroblastos apresentaram 80% de viabilidade ou retardo na apoptose após 24 horas de infecção *in vitro* comparado a neutrófilos não-infectados.

Assim como em outros tipos celulares, a via apoptótica em neutrófilos é executada por caspases, incluindo caspases -1, -3, -4 e -8 (YAMASHITA et al., 1999; SANTOS-BENEIT; MOLLINEDO; 2000). De maneira geral, células infectadas por *T. gondii* falham na ativação

de caspases 8, 9 e 3 e isto pode explicar a resistência de células infectadas a estímulos apoptóticos. Além disto, a inibição das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca por *T. gondii* foi mostrada ser dependente da ativação de NF- κ B e de inibição da liberação do citocromo c, acompanhada da degradação de proteínas pró-apoptóticas e aumento na transcrição de proteínas anti-apoptóticas, tal como Bcl-2 (SHAPIRA et al., 2002; PAYNE et al., 2003; MOLESTINA et al., 2003; KIM et al., 2006; CARMEN; HARDI; SINAI, 2006; HIPPE et al., 2009).

Considerando o nosso modelo experimental, nós podemos sugerir que na ausência de galectina-3 endógena, neutrófilos não-infectados estão mais susceptíveis à morte celular, a qual pode ocorrer por apoptose, uma vez que estas células exibem aumentada exposição de PS. Por outro lado, quando neutrófilos são cultivados por períodos de tempo maiores, como aquele de 18 horas utilizado em nosso estudo, mesmo em presença de galectina-3, a exposição de PS na superfície celular aumenta. Porém, em contrapartida, na ausência de galectina-3, a porcentagem de morte celular aumenta significativamente (Figura 11). Deste modo, podemos sugerir que galectina-3 endógena atua como uma molécula anti-apoptótica em neutrófilos não-infectados. Este papel de galectina-3 foi reforçado quando avaliamos a exposição de PS e morte celular em neutrófilos após infecção por *T. gondii*. Nesta condição, durante o período inicial de interação entre célula e parasito (30 minutos), embora observou-se maior exposição de PS em presença de galectina-3, a ausência da lectina foi associada com maior morte celular (Figura 11). Por outro lado, em presença da galectina-3, neutrófilos infectados com *T. gondii* apresentaram considerável viabilidade até 24 horas em cultura. Estes dados concordam com a literatura apresentada acima nesta discussão. No entanto, na ausência de galectina-3, não observamos aumento na viabilidade de neutrófilos induzida por *T. gondii* (Figura 12). Diante disto, é possível afirmar que na ausência de galectina-3, a infecção de neutrófilos por *T. gondii* não foi suficiente para reduzir a exposição de PS e morte celular, como observado em

neutrófilos Gal-3^{+/+}. Assim, galectina-3 mostrou ser uma molécula importante na modulação da viabilidade de neutrófilos independentemente de um processo inflamatório, bem como necessária para a inibição da apoptose de neutrófilos induzida por *T. gondii*. Talvez este efeito de galectina-3 relacionado à inibição de apoptose por *T. gondii* possa estar associado com a ativação de vias de sinalização anti-apoptóticas comuns entre galectina-3 endógena e *T. gondii*. Por exemplo, como descrito anteriormente, efeitos anti-apoptóticos de ambos, galectina-3 e *T. gondii*, estão associados com a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e inibição da liberação do citocromo c a partir da mitocôndria (MOON et al., 2001).

No presente estudo, nós também avaliamos a atividade de LDH como uma medida indireta da viabilidade celular e de toxicidade causada pela infecção por *T. gondii* em neutrófilos de ambas as linhagens de camundongos. Os resultados obtidos mostraram que galectina-3 reduz a morte celular tempo-dependente em neutrófilos não-infectados. De maneira semelhante, sob condição de infecção por *T. gondii*, galectina-3 também diminuiu os efeitos de toxicidade do parasito em neutrófilos (Figura 13). Assim, estes resultados reforçam o papel imunomodulador de galectina-3 endógena sobre a viabilidade de neutrófilos, bem como sua função anti-apoptótica (BOILEAU et al., 2008).

A produção de citocinas por neutrófilos peritoneais inflamatórios que podem estar envolvidas na modulação da infecção por *T. gondii* durante o seu estágio inicial, tais como IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 também foram avaliadas neste estudo. Um número crescente de citocinas derivadas de neutrófilos importantes para vários processos imunes e inflamatórios *in vivo* tem sido descrito (CLOUTIER et al., 2009). A produção de IL-10 por neutrófilos foi descrita durante infecção com *Candida albicans* (ROMANI et al., 1997). A citocina TNF- α também é produzida por neutrófilos e tem um papel importante em mediar ativação de células dendríticas, bem como induzir a produção de TNF- α por estas células (BENNOUNA; DENKERS, 2005). IL-6 normalmente é produzida em resposta a

microrganismos e a outras citocinas, notavelmente IL-1 e TNF- α , e está associada com a indução da síntese de proteínas de fase aguda e, portanto, contribui para os efeitos sistêmicos da inflamação, bem como estimula a produção de neutrófilos na medula óssea (ASENSI et al, 2004).

Em nosso modelo experimental observamos que a secreção de IL-10 e TNF- α por neutrófilos peritoneais inflamatórios foi dependente de galectina-3, mas não da infecção por *T. gondii*, sendo a presença de galectina-3 associada com maior produção de IL-10 e sua ausência relacionada a maior produção de TNF- α . Por outro lado, a produção de IL-6 foi associada com a infecção pelo parasito e ausência de Gal-3, uma vez que maiores níveis de IL-6 foram produzidos por neutrófilos Gal-3^{-/-} infectados por *T. gondii*. Baixos níveis de IL-12, IFN- γ e IL-4 foram detectados no presente desenho experimental, como demonstrado pelos valores obtidos localizados próximos ao limite de sensibilidade para os respectivos ensaios e, conseqüentemente, nenhuma diferença foi observada entre neutrófilos de ambas as linhagens (Figura 14). Estes resultados sugerem que a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} e sua liberação para o meio extracelular pode representar um mecanismo de controle negativo da produção de citocinas pró-inflamatórias, visando a proteção das células dos efeitos patológicos dessas citocinas. Uma vez que, a produção de TNF- α por neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} foi oposta à de IL-10, ou seja, maiores níveis de TNF- α coincidiram com menores níveis de IL-10, estes achados reforçam o efeito de IL-10 na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Como níveis maiores de IL-10 foram produzidos por neutrófilos Gal-3^{+/+} e, ao contrário, maiores níveis de TNF- α foram produzidos por neutrófilos Gal-3^{-/-}, novamente, galectina-3 parece ser importante na proteção e regulação da viabilidade de neutrófilos. Com relação à liberação de IL-6 por neutrófilos, parece que galectina-3 modula a produção desta citocina, uma vez que foi notável a maior produção desta citocina por neutrófilos Gal-3^{-/-} na presença da infecção por *T. gondii*.

Portanto, o balanço entre a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por neutrófilos peritoneais inflamatórios parece ser dependente de galectina-3 e, em menor grau, pela infecção por *T. gondii*.

Uma vez no tecido inflamado, os neutrófilos dispõem de vários mecanismos microbicidas e imunomoduladores visando a destruição do parasito. Como já descrito, a ferramenta chave dos neutrófilos é a sua habilidade para fagocitar o agente causador do processo inflamatório, sendo que a desgranulação é um fenômeno que acompanha tal processo. Neste sentido, nós avaliamos em nosso modelo experimental se a infecção de neutrófilos e galectina-3 estavam associados à desgranulação dos neutrófilos.

Nossos dados mostraram que independentemente da infecção por *T. gondii*, ambos neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} expostos a um tempo maior de cultura (18 horas no nosso modelo experimental), exibiram liberação do conteúdo dos seus grânulos, como demonstrado pela liberação de lisozima. Entretanto, foi possível observar que a infecção por *T. gondii* aumentou a desgranulação dos neutrófilos Gal-3^{+/+} (Figura 15). Neste sentido, sugerimos que o efeito da infecção por *T. gondii* sobre a desgranulação de neutrófilos Gal-3^{-/-} pode não ter sido detectado porque após 18 horas em cultura estas células já estão com a viabilidade bastante diminuída (Figura 12). Com relação ao envolvimento de galectina-3 nesse processo, mais uma vez foi possível observar que essa lectina atua no sentido de proteger a célula de sua morte, uma vez que quantidades significativamente maiores de lisozima foram liberadas na sua ausência. Esta hipótese pode ser sustentada pelo fato de que a desgranulação é um importante evento inflamatório secundário à ativação dos neutrófilos, após o qual essas células tendem a serem eliminadas.

Fernández e cols. (2005) demonstraram que a incubação de neutrófilos com galectina-3 humana recombinante provocou a desgranulação de neutrófilos determinada pela expressão na superfície celular do marcador CD66b, o qual é normalmente encontrado em grânulos

específicos nessas células. Esses dados comparados aos nossos, sugerem diferenças para a função imunomoduladora de galectina-3 endógena e exógena nos sistemas biológicos.

Continuando o nosso estudo, verificamos se a estimulação *in vitro* de neutrófilos com taquizoítas de *T. gondii*, sob diferentes tratamentos, poderia interferir com o metabolismo gerador de ROS dessas células e se galectina-3 modulava essa função celular. Nossos resultados mostraram que a estimulação de neutrófilos Gal-3^{+/+} com os parasitos causou diminuída geração de ROS por essas células após estimulação com PMA. Por outro lado, a geração de ROS por neutrófilos na ausência de galectina-3 não foi diferente do controle após estimulação com *T. gondii*, mas foi sempre maior comparada aos neutrófilos Gal-3^{+/+} (Figura 16). Estes dados, assim como aqueles dos experimentos de infecção *in vivo*, sugerem que galectina-3 modula a geração de ROS por neutrófilos. Além disto, nós observamos, nos experimentos de infecção *in vivo* e naqueles de infecção *in vitro*, que o parasito por si só não alterou a liberação espontânea de ROS comparado aos controles.

Interessantemente, a estimulação de neutrófilos com *T. gondii* inativado e opsonizado com IgG anti-RH (TgIO/IgG), ao contrário do esperado, não desencadeou por si só, na ausência de PMA, ativação do metabolismo gerador de ROS em neutrófilos. Este resultado despertou curiosidade, uma vez que está bem estabelecido na literatura, a ativação de neutrófilos opsonina-dependente via interação com receptores de membrana (HUIZINGA et al., 1989).

Neste sentido, nós verificamos se a ativação do metabolismo gerador de ROS em neutrófilos induzida por um estímulo dependente de interação com receptores na superfície celular era alterada após a estimulação dos neutrófilos *in vitro* com *T. gondii*. Nesses experimentos foi utilizado zimosan como estímulo para ativação da geração de ROS em neutrófilos. Nossos resultados mostraram, então, que a estimulação de neutrófilos com taquizoítas de *T. gondii* ativo ou inativado e opsonizado com IgG anti-RH inibiu a ativação do

metabolismo gerador de ROS induzida por diferentes concentrações de zimosan em ambos os neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} (Figura 17). Uma provável explicação para este fato seria que os parasitos poderiam aderir aos neutrófilos, de forma a impedir o acesso dos receptores na superfície celular aos fragmentos Fc de imunoglobulinas; ainda, outro mecanismo possível seria a modulação negativa pelo parasito da expressão de receptores ligantes de zimosan. Estas hipóteses poderiam, então, explicar porque *T. gondii* opsonizado não causou ativação do metabolismo gerador de ROS em neutrófilos. Vale ressaltar que esses efeitos de inibição da geração de ROS observados em neutrófilos após estimulação com zimosan não foram influenciados por galectina-3, uma vez que ocorreram na ausência e em presença dessa lectina. Todavia, assim como nos experimentos utilizando PMA, na ausência de galectina-3 e independentemente da estimulação com *T. gondii*, os neutrófilos produziram significativamente maiores quantidades de ROS.

Em sequência aos dados já obtidos, verificamos se a estimulação de neutrófilos Gal-3^{+/+} e Gal-3^{-/-} com o antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) poderia induzir alterações no metabolismo gerador de ROS em neutrófilos. Estes resultados mostraram novamente, como após a estimulação com os parasitos, que na ausência de galectina-3 os neutrófilos foram mais responsivos ao estímulo ativador da geração de ROS, independentemente da presença e da concentração de antígeno utilizada. Já em presença de galectina-3, observou-se diminuição na geração de ROS por neutrófilos previamente estimulados com a maior concentração de STAg utilizada (Figura 18), sendo que este resultado é semelhante àqueles obtidos quando neutrófilos foram estimulados *in vitro* com *T. gondii* (Figura 16). Além disto, o antígeno por si só também não alterou a liberação espontânea de ROS comparado aos controles. Esses resultados reforçam, portanto, o papel imunomodulador da galectina-3 sobre a geração de ROS em neutrófilos.

6 CONCLUSÕES

No modelo de infecção *in vivo* por cepa virulenta RH de *T. gondii*:

- Galectina-3 influencia positivamente no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 após estimulação com tioglicolato, mas não após infecção por *T. gondii*;
- Galectina-3 não interfere na sobrevivência de camundongos C57BL/6, após infecção com a cepa virulenta RH de *T. gondii*;
- Galectina-3 modula diferentemente a geração de ROS em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* e de animais não-infectados, com geração de ROS diminuída em neutrófilos de animais não-infectados e aumentada em neutrófilos de animais infectados.

No modelo de infecção *in vitro* por cepa virulenta RH de *T. gondii*:

- Galectina-3 modula a viabilidade de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 independente da infecção por *T. gondii*, com diminuição de alterações apoptóticas e morte celular. Em presença da infecção por *T. gondii*, galectina-3 está envolvida no aumento da viabilidade celular e nas alterações apoptóticas diminuídas em neutrófilos peritoneais inflamatórios induzidas pelo parasito.

- Galectina-3 diminui a toxicidade, determinada pela liberação de LDH, causada pela infecção por *T. gondii* em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6, como também a morte celular tempo-dependente em neutrófilos peritoneais inflamatórios não-infectados.
- Galectina-3 modula a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 na presença e na ausência de infecção por *T. gondii*, estando relacionada com níveis precoces aumentados de IL-10 e diminuídos de TNF- α , independente da infecção pelo parasito, e com níveis precoces de IL-6 diminuídos associados com a infecção.
- Galectina-3 diminui a desgranulação, determinada pela liberação de lisozima, de neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6, independentemente da infecção por *T. gondii*.
- Galectina-3 modula negativamente a geração de ROS dependente de PMA em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 na ausência da infecção por *T. gondii* ou de estímulo com STAg, bem como está envolvida na diminuição da geração de ROS dependente de PMA induzida por diferentes estímulos de *T. gondii* ou alta concentração de STAg.
- Galectina-3 modula negativamente a geração de ROS dependente de zimosan em neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 na ausência da infecção por *T. gondii*, mas não interfere na diminuição da geração de ROS dependente de zimosan induzida pela infecção pelo parasito.

Considerando os resultados obtidos nos dois modelos de infecção, pode-se concluir que galectina-3 desempenha importante papel imunomodulador sobre neutrófilos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6, sob condição de infecção *in vivo* e *in vitro* pela cepa virulenta RH de *T. gondii*, particularmente durante seu estágio inicial, por interferir com a viabilidade e ativação de neutrófilos.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; HUNTER, C. A. Immunoregulation during Toxoplasmosis. **Chemical Immunology**, Basel, v. 70, p. 81-102, 1998.

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 5, n. 2, p. 162-170, 2005.

ALMKVIST, J.; FÄLDT, J.; DAHLGREN, C.; LEFFLER, H.; KARLSSON, A. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, n. 2, p. 832-837, 2001.

ALVES, C. M.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; CARVALHO, I. F.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**, London, v. 60, n. 2-3, p. 601-608, 2003.

ARAUJO, F. G. Depletion of CD4⁺ T cells but not inhibition of the protective activity of IFN-γ prevents cure of toxoplasmosis mediated by drug therapy in mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 149, n. 9, p. 3003-3007, 1992.

ASENSI, V.; VALLE, E.; MEANA, A.; FIERER, J.; CELADA, A.; ALVAREZ, V.; PAZ, J.; COTO, E.; CARTON, J. A.; MARADONA, J. A.; DIEGUEZ, A.; SARASÚA, J.; OCAÑA, M. G.; ARRIBAS, J. M. In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 72, n. 7, p. 3823-3828, 2004.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, New York, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BABIOR, B. M.; NADPH oxidase: an update. **Blood**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1464 – 1476, 1999.

BARON, E. J.; PROCTOR, R. A. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 305-313, 1982.

BARONDES, S. H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D. N.; CUMMINGS, R. D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M. A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K.; LEFFLER, H.; LIU, F.; LOTAN, R.; MERCURIO, A. M.; MONSIGNY, M.; PILLAI, S.; POIRER, F.; RAZ, A.; RIGBY, P. W. J.; RINI, J. M.; WANG, J. L. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, Cambridge, v. 76, n. 4, p. 597-598, 1994.

BARTENEVA, N.; THEODOR, I.; PETERSON, E. M.; DE LA MAZA, L. M. Role of neutrophils in controlling early stages of a Chlamydia trachomatis infection. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 64, n. 11, p. 4830-4833, 1996.

BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of Neospora caninum in vivo. **Parasitology**, London, v. 133, n. Pt 4, p. 421-32, 2006.

BEATTY, W. L.; RHOADES, E. R.; HSU, D. K.; LIU, F. T.; RUSSELL, D. G. Association of a macrophage galactoside-binding protein with Mycobacterium-containing phagosomes. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 167-176, 2002.

BENNOUNA, S.; BLISS, S. K.; CURIEL, T. J.; DENKERS, E. Y. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, n. 11, p. 6052-6058, 2003.

BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, n. 8, p. 4845-4851, 2005.

BERNARDES, E. S.; SILVA, N. M.; RUAS, L. P.; MINEO, J. R.; LOYOLA, A. M.; HSU, D. K.; LIU, F. T.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 168, n. 6, p. 1910-1920, 2006.

BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, n. 8, p. 4515-4521, 2000.

BLISS, S. K.; GAVRILESCU, L. C.; ALCARAZ, A.; DENKERS, E. Y. Neutrophil depletion during Toxoplasma gondii infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, n. 8, p. 4898-4905, 2001.

BLISS, S. K.; MARSHALL, A. J.; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 162, n. 12, p. 7369-7375, 1999.

BLISS, S. K.; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 4, p. 2081-2088, 1999.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 62, n. 5, p. 1761-1767, 1994.

BOILEAU, C.; POIRIER, F.; PELLETIER, J. P.; GUÉVREMONT, M.; DUVAL, N.; MARTEL-PELLETIER, J.; REBOUL, P. Intracellular localisation of galectin-3 has a protective role in chondrocyte survival. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 67, n. 2, p. 175-181, 2008.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, New York, v. 89, n. 10, p. 3503-3521, 1997.

BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 340-345, 2007.

BRACH, M. A.; DEVOS, S.; GRUSS, H. J.; HERRMANN, F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. **Blood**, New York, v. 80, n. 11, p. 2920-2924, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRYBORN, M.; ADNER, M.; CARDELL, L. O. Psoriasin, one of several new proteins identified in nasal lavage fluid from allergic and non-allergic individuals using 2-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Respiratory Research**, London, v. 6, n. 1, p. 118-127, 2005.

BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 9, p. 5216-5224, 2002.

CABANIS, A.; GRESSIER, B.; BRUNET, C.; DINE, T.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J. C. Effect of the protein kinase C inhibitor GF 109 203X on elastase release and respiratory burst of human neutrophils. **General Pharmacology**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 1409-1414, 1996.

CARMEN, J. C.; HARDI, L.; SINAI, A. P. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 301-315, 2006.

CARMEN, J. C.; SINAI, A. P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 904-916, 2007.

CASSATELLA, M. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BERTAGNIN, A.; LUSTER, A. D.; MCDONALD, P. P. Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 27, n. 1, p. 111-115, 1997.

CHANNON, J. Y.; MISELIS, K. A.; MINNS, L. A.; DUTTA, C.; KASPER, L. H. *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 11, p. 6048-6057, 2002.

CHARDÈS, T.; BOURGUIN, I.; MEVELEC, M. N.; DUBREMETZ, J. F.; BOUT, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 1240-1246, 1990.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A. C.; ROBINSON, M. F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 130, n. 5, p. 2324-2329, 1983.

CLOUTIER, A.; GUINDI, C.; LARIVÉE, P.; DUBOIS, C. M.; AMRANI, A.; MCDONALD, P. P. Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, n. 1, p. 563-571, 2009.

COBEA Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para Técnicos em Bioterismo**, 2. ed. São Paulo: COBEA, FINEP, 1996. 259 p.

COHN, Z. A. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 121, n. 3, p. 813-816, 1978.

COLOTTA, F.; RE, F.; POLENTARUTTI, N.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, New York, v. 80, n. 8, p. 2012-2020, 1992.

CONLAN, J. W. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 65, n. 2, p. 630-635, 1997.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F. T. Galectins In: VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E. (Ed). **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: CSH, 2009, 784p.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, New York, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.

DÄUBENER, W.; REMSCHEID, C.; NOCKEMANN, S.; PILZ, K.; SEGHROUCHNI, S.; MACKENZIE, C.; HADDING, U. Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 26, n. 2, p. 487-492, 1996.

DECOURSEY, T. E.; LIGETI, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, n. 19-20, p. 2173-2193, 2005.

DEL RIO, L.; BUENDÍA, A. J.; SÁNCHEZ, J.; GALLEGÓ, M. C.; CARO, M. R.; ORTEGA, N.; SEVA, J.; PALLARÉS, F. J.; CUELLO, F.; SALINAS, J. Endogenous interleukin-12 is not required for resolution of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, n. 8, p. 4808-4815, 2001.

DEL RIO, L.; BUTCHER, B. A.; BENNOUNA, S.; HIENY, S.; SHER, A.; DENKERS, E. Y. Toxoplasma gondii triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 11, p. 6954-6960, 2004.

DEN OTTER, W.; DE GROOT, J. W.; VAN BASTEN, C. D.; RADEMAKERS, L. H.; DE WEGER, R. A.; PELS, E. Brewer thioglycolate medium induces different exudates in guinea pigs and mice. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 36, n. 3, p. 403-413, 1982.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A.; DEL RIO, L.; BENNOUNA, S. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 411-421, 2004.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

DENKERS, E. Y.; KIM, L.; BUTCHER, B. A. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during Toxoplasma gondii infection. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 75-83, 2003.

DENKERS, E. Y.; SHER, A.; GAZZINELLI, R. T. CD8⁺ T-cell interactions with Toxoplasma gondii: implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. **Research in Immunology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 51-57, 1993.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BERGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, New York, v. 30, n. 5, p. 769-789, 1985.

DONG, S.; HUGHES, R. C. Galectin-3 stimulates uptake of extracellular Ca²⁺ in human Jurkat T-cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 395, n. 2-3, p. 165-169, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1760, n. 4, p. 616-635, 2006.

FADEEL, B.; AHLIN, A.; HENTER, J. I.; ORRENIUS, S.; HAMPTON, M. B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. **Blood**, New York, v. 92, n. 12, p. 4808-4818, 1998.

FADOK, V. A.; SAVILL, J. S.; HASLETT, C.; BRATTON, D. L.; DOHERTY, D. E.; CAMPBELL, P. A.; HENSON, P. M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 149, n. 12, p. 4029-4035, 1992.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FERNÁNDEZ, G. C.; ILARREGUI, J. M.; RUBEL, C. J.; TOSCANO, M. A.; GÓMEZ, S. A.; BEIGIER BOMPADRE, M.; ISTURIZ, M. A.; RABINOVICH, G. A.; PALERMO, M. S. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. **Glycobiology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 519-527, 2005.

FEUK-LAGERSTEDT, E.; JORDAN, E. T.; LEFFLER, H.; DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 10, p. 5592-5598, 1999.

FRIGERI, L. G.; LIU, F. T. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148, n. 3, p. 861-867, 1992.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; OKA, N.; YOSHII, T.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; KANAYAMA, H. O.; KIM, H. R.; RAZ, A. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 10, p. 3376-3379, 2004.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHII, T.; KIM, H. R.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; KAGAWA, S.; RAZ, A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Research**, Chicago, v. 63, n. 23, p. 8302-8311, 2003.

GAVRILESCU, L. C.; DENKERS, E. Y. Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoan infection. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 11, p. 6109-6115, 2003.

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

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 153, n. 6, p. 2533-2543, 1994.

GIGLEY, J. P.; FOX, B. A.; BZIK, D. J. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, n. 2, p. 1069-1078, 2009.

GOEBEL, S.; GROSS, U.; LÜDER, C. G. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. **Journal of Cell Science**, London, v. 114, n. Pt 19, p. 3495-3505, 2001.

GOUWY, M.; STRUYF, S.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 561-580. 2005.

GOYAL, M.; GANGULY, N. K.; MAHAJAN, R. C. Immunological response in experimentally reactivated toxoplasmosis in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 178, n. 5, p. 269-278, 1989.

GUPTA, S. K.; MASINICK, S.; GARRETT, M.; HAZLETT, L. D. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 65, n. 7, p. 2747-2753, 1997.

HALLIWELL, B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radical Research**, London, v. 31, n. 4, p. 261-272, 1999.

HANADA, M.; AIMÉ-SEMPÉ, C.; SATO, T.; REED, J. C. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 20, p. 11962-11969, 1995.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **British Medical Bulletin**, London, v. 53, n. 3, p. 669-683, 1997.

HAZIOT, A.; RONG, G. W.; SILVER, J.; GOYERT, S. M. Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 3, p. 1500-1507, 1993.

HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, New York, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005.

HIPPE, D.; GAIS, A.; GROSS, U.; LÜDER, C. G. Modulation of caspase activation by *Toxoplasma gondii*. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 470, p. 275-288, 2009.

HO, M. K.; SPRINGER, T. A. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 128, n. 3, p. 1221-1228, 1982.

HOMBURG, C. H.; DE HAAS, M.; VON DEM BORNE, A. E.; VERHOEVEN, A. J.; REUTELINGSPERGER, C. P.; ROOS, D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. **Blood**, New York, v. 85, n. 2, p. 532-540, 1995.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

HRDLICKOVÁ, R.; NEHYBA, J.; BOSE, H. R. J. Interferon regulatory factor 4 contributes to transformation of v-Rel-expressing fibroblasts. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 21, n. 19, p. 6369-6386, 2001.

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. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 156, n. 3, p. 1073-1083, 2000.

HU, M. S.; SCHWARTZMAN, J. D.; YEAMAN, G. R.; COLLINS, J.; SEGUIN, R.; KHAN, I. A.; KASPER, L. H. Fas-FasL interaction involved in pathogenesis of ocular toxoplasmosis in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 928-935, 1999.

HUIZINGA, T.W.; VAN KEMENADE, F.; KOENDERMAN, L.; DOLMAN, K.M.; VON DEM BORNE, A.E.; TETTEROO, P.A.; ROOS, D. The 40-kDa Fc gamma receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 142, n. 7, p. 2365-2369, 1989.

ISMAIL, N.; OLANO, J. P.; FENG, H. M.; WALKER, D. H. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 207, n. 2, p. 111-120, 2002.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D.; SANDERS-LEWIS, K.; WILSON, M. Toxoplasma gondii infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 405-410, 2007.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, n. 1, p. 61-65, 2004.

KARLSSON, A.; FOLLIN, P.; LEFFLER, H.; DAHLGREN, C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. **Blood**, New York, v. 91, n. 9, p. 3430-3438, 1998.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.

KETTRITZ, R.; GAIDO, M. L.; HALLER, H.; LUFT, F. C.; JENNETTE, C. J.; FALK, R. J. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. **Kidney International**, New York, v. 53, n. 1, p. 84-91, 1998.

KHAN, W. I.; BLENNERHASSETT, P. A.; DENG, Y.; GAULDIE, J.; VALLANCE, B. A.; COLLINS, S. M. IL-12 gene transfer alters gut physiology and host immunity in nematode-infected mice. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 281, n. 1, p. G102-G110, 2001.

KIM, J. Y.; AHN, M. H.; JUN, H. S.; JUNG, J. W.; RYU, J. S.; MIN, D. Y. Toxoplasma gondii inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 47, n. 6, p. 862-869, 2006.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; DA FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin paecalantone on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 6, p. 905-908, 2003.

KLEIN, J. **Immunology**. Boston: Blackwell Science Inc., 1990, 528p.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 14, p. 1337-1344, 2003.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 69, n. 1, p. 33-42, 2001.

KRZEŚLAK, A.; LIPIŃSKA, A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wrocław, v. 9, n. 2, p. 305-328, 2004.

KUWABARA, I.; LIU, F. T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 156, n. 10, p. 3939-3944, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, 2008.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 213, n. 3-4, p. 183-191, 2008.

LAWEN, J. G.; DAVIES, E. A.; MOURAD, G.; OPPENHEIMER, F.; MOLINA, M. G.; ROSTAING, L.; WILKINSON, A. H.; MULLOY, L. L.; BOURBIGOT, B. J.; PRESTELLE, H.; KORN, A.; GIRAULT, D.; SIMULECT INTERNATIONAL STUDY GROUP. Randomized double-blind study of immunoprophylaxis with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody, in combination with mycophenolate mofetil-containing triple therapy in renal transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v. 75, n. 1, p. 37-43, 2003.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.

LEIJH, P. C.; VAN ZWET, T. L.; TER KUILE, M. N.; VAN FURTH, R. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, Bethesda v. 46, n. 2, p. 448-452, 1984.

LIESENFELD, O.; KOSEK, J. C.; SUZUKI, Y. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 65, n. 11, p. 4682-4689, 1997.

LIU, F. T.; HSU, D. K. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. **Drug News & Perspectives**, Barcelona, v. 20, n. 7, p. 455-460, 2007.

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. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 147, n. 4, p. 1016-1028, 1995.

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

LIU, Q.; KISHIMOTO, T. K.; MAINOLFI, E.; DELEON, R. P.; MYERS, C.; MORETZ, R. C. Dynamic expression of L-selectin in cell-to-cell interactions between neutrophils and endothelial cells in vitro. **Experimental Cell Research**, New York, v. 243, n. 1, p. 87-93, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCISANO-VALIM, Y. M.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M.; POLIZELLO, A. C.; AZZOLINI, A. E.; SILVA, S. C.; LOPES, J. L.; DE OLIVEIRA, C. A.; MANTOVANI, B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 47, n. 1, p. 53-58, 2002.

LÜDER, C. G.; STANWAY, R. R.; CHAUSSEPIED, M.; LANGSLEY, G.; HEUSSLER, V. T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 163-173, 2009.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago v. 15, n. 2, p. 211-222, 1992.

MANDRELL, R. E.; APICELLA, M. A.; LINDSTEDT, R.; LEFFLER, H. Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. **Methods in Enzymology**, New York, v. 236, p. 231-254, 1994.

MATARRESE, P.; FUSCO, O.; TINARI, N.; NATOLI, C.; LIU, F. T.; SEMERARO, M. L.; MALORNI, W.; IACOBELLI, S. Galectin-3 over expression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 85, n. 4, p. 545-554, 2000.

MAUBON, D.; AJZENBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M. P.; DARDÉ, M. L.; PELLOUX, H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 299-303, 2008.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, n. 1, p. 62-66, 2004.
MCPHAIL, L. C.; STRUM, S. L.; LEONE, P. A.; SOZZANI, S. The neutrophil respiratory burst mechanism. **Immunology Series**, New York, v. 57, p. 47-76, 1992.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; DEL SERO, G.; FÉ D'OSTIANI, C.; MOSCI, P.; TRINCHIERI, G.; ADORINI, L.; ROMANI, L. IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 161, n. 11, p. 6228-6237, 1998.

MEY, A.; LEFFLER, H.; HMAMA, Z.; NORMIER, G.; REVILLARD, J. P. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 156, n. 4, p. 1572-1577, 1996.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2009.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. S.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

MOLESTINA, R. E.; PAYNE, T. M.; COPPENS, I.; SINAI, A. P. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. **Journal of Cell Science**, London, v. 116, n. Pt 21, p. 4359-4371, 2003.

MOON, B. K.; LEE, Y. J.; BATTLE, P.; JESSUP, J. M.; RAZ, A.; KIM, H. R. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 159, n. 3, p. 1055-1060, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUTSATSOS, I. K.; WADE, M.; SCHINDLER, M.; WANG, J. L. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 84, n. 18, p. 6452-6456, 1987.

NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis**, London, v. 10, n. 2, p. 267-275, 2005.

NASH, P. B.; PURNER, M. B.; LEON, R. P.; CLARKE, P.; DUKE, R. C.; CURIEL, T. J. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, n. 4, p. 1824-1830, 1998.

NIEMINEN, J.; KUNO, A.; HIRABAYASHI, J.; SATO, S. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 2, p. 1374-1383, 2007.

NIEMINEN, J.; ST-PIERRE, C.; SATO, S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 78, n. 5, p. 1127-1135, 2005.

OFEK, I.; GOLDHAR, J.; KEISARI, Y.; SHARON, N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 239-276, 1995.

OHSHIMA, S.; KUCHEN, S.; SEEMAYER, C. A.; KYBURZ, D.; HIRT, A.; KLINZING, S.; MICHEL, B. A.; GAY, R. E.; LIU, F. T.; GAY, S.; NEIDHART, M. Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 48, n. 10, p. 2788-2795, 2003.

OMATA, Y.; TERADA, K.; TAKA, A.; ISAMIDA, T.; KANDA, M.; SAITO, A. Positive evidence that anti-Toxoplasma gondii IgA antibody exists in the intestinal tract of infected cats and exerts protective activity against the infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 1-11, 1997.

PAYNE, T. M.; MOLESTINA, R. E.; SINAI, A. P. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the Toxoplasma gondii-mediated blockade of host apoptosis. **Journal of Cell Science**, London, v. 116, n. Pt 21, p. 4345-4358, 2003.

PEDROSA, J.; SAUNDERS, B. M.; APPELBERG, R.; ORME, I. M.; SILVA, M. T.; COOPER, A. M. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 68, n. 2, p. 577-583, 2000.

PELLETIER, I.; SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by Leishmania major through species-specific polygalactose epitope. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 20, p. 17663-17670, 2002.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, 872p.

PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **Journal of Interferon Research**, New York, v. 6, n. 3, p. 267-279, 1986.

PULLAR, J. M.; VISSERS, M. C.; WINTERBOURN, C. C. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 50, n. 4-5, p. 259-266, 2000.

QUINN, M. T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 76, n. 4, p. 760-781, 2004.

RABINOVICH, G. A.; BAUM, L. G.; TINARI, N.; PAGANELLI, R.; NATOLI, C.; LIU, F. T.; IACOBELLI, S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 313-320, 2002.

RAO, T. S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 269, n. 3, p. 917-925, 1994.

REIS, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R. N.; SHER, A. In Vivo Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand-independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 186, n. 11, p. 1819-1829, 1997.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Americas e na Africa**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856p.

ROBBEN, P. M.; MORDUE, D. G.; TRUSCOTT, S. M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, L. D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 6, p. 3686-3694, 2004.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; DEL SERO, G.; NICOLETTI, I.; TRINCHIERI, G.; BISTONI, F.; PUCCETTI, P. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 158, n. 11, p. 5349-5356, 1997.

ROSSO, F.; LES, J. T.; AGUDELO, A.; VILLALOBOS, C.; CHAVES, J. A.; TUNUBALA, G. A.; MESSA, A.; REMINGTON, J. S.; MONTROYA, J. G. Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 78, n. 3, p. 504-508, 2008.

SAEGUSA, J.; HSU, D. K.; LIU, W.; KUWABARA, I.; KUWABARA, Y.; YU, L.; LIU, F. T. Galectin-3 protects keratinocytes from UVB-induced apoptosis by enhancing AKT activation and suppressing ERK activation. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 128, n. 10, p. 2403-2411, 2008.

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 476-481, 2005.

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. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 112, n. 3, p. 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. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, n. 4, p. 2156-2164, 2000.

SANTOS-BENEIT, A. M.; MOLLINEDO, F. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 67, n. 5, p. 712-724, 2000.

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

SATO, S.; HUGHES, R. C. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 6, p. 4424-4430, 1994.

SATO, S.; OUELLET, N.; PELLETIER, I.; SIMARD, M.; RANCOURT, A.; BERGERON, M. G. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 168, n. 4, p. 1813-1822, 2002.

SAVILL, J. S.; WYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M. J.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 83, n. 3, p. 865-875, 1989.

SAYLES, P. C.; JOHNSON, L. L. Exacerbation of toxoplasmosis in neutrophil-depleted mice. **Natural Immunity**, Basel, v. 15, n. 5, p. 249-258, 1996.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, New York, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SHAPIRA, S.; SPEIRS, K.; GERSTEIN, A.; CAAMANO, J.; HUNTER, C. A. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, n. Suppl 1, p. S66-72, 2002.

SILVA, D. A.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 234-44, 2007.

SIM, S.; PARK, S. J.; YONG, T. S.; IM, K. I.; SHIN, M. H. Involvement of beta 2-integrin in ROS-mediated neutrophil apoptosis induced by *Entamoeba histolytica*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 11, p. 1368-1375, 2007.

SINAI, A. P.; PAYNE, T. M.; CARMEN, J. C.; HARDI, L.; WATSON, S. J.; MOLESTINA, R. E. Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 381-391, 2004.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 58, n. 6, p. 731-6, 1949.

SPALDING, S. M.; AMENDOEIRA, M. R.; KLEIN, C. H.; RIBEIRO, L. C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 173-177, 2005.

STEPHEN, F. D.; KELLEHER, R. J. J.; LANGNER, M.; REPASKY, E. A. Dietary fatty acids alter the adhesion properties of lymphocytes to extracellular matrix proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 400B, p. 775-788, 1997.

STOWELL, S. R.; QUAN, Y.; KARMAKAR, S.; KOYAMA N. S.; DIAS-BARUFFI, M.; LEFFLER, H.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, 2008.

SUKHUMAVASI, W.; EGAN, C. E.; DENKERS, E. Y. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 179, n. 6, p. 3570-3577, 2007.

TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; YOSHII, T.; OKA, N.; INOHARA, H.; KIM, H. R.; BRESALIER, R. S.; RAZ, A. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, n. 10, p. 4395-4406, 2004.

TAYLOR, R. C., CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VAN DEN BERG, T. K.; HONING, H.; FRANKE, N.; VAN REMOORTERE, A.; SCHIPHORST, W. E.; LIU, F. T.; DEELDER, A. M.; CUMMINGS, R. D.; HOKKE, C. H.; VAN DIE, I. LactiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 173, n. 3, p. 1902-1907, 2004.

VAN GISBERGEN, K. P.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 626-631, 2005.

WILKIE, R. P.; VISSERS, M. C.; DRAGUNOW, M.; HAMPTON, M. B. A functional NADPH oxidase prevents caspase involvement in the clearance of phagocytic neutrophils. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 75, n. 7, p. 3256-3263, 2007.

YAMAOKA, A.; KUWABARA, I.; FRIGERI, L. G.; LIU, F. T. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 154, n. 7, p. 3479-3487, 1995.

YAMASHITA, K.; TAKAHASHI, A.; KOBAYASHI, S.; HIRATA, H.; MESNER, P. W. J.; KAUFMANN, S. H.; YONEHARA, S.; YAMAMOTO, K.; UCHIYAMA, T.; SASADA, M. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. **Blood**, New York, v. 93, n. 2, p. 674-685, 1999.

YANG, R. Y.; HSU, D. K.; LIU, F. T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 93, n. 13, p. 6737-6742, 1996.

YOSHII, T.; FUKUMORI, T.; HONJO, Y.; INOHARA, H.; KIM, H. R.; RAZ, A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 9, p. 6852-6857, 2002.

YU, F.; FINLEY, R. L. J.; RAZ, A.; KIM, H. R. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 18, p. 15819-15827, 2002.

ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 14, p. 1289-1291, 2003.