

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena,  
sobre funções de neutrófilos

Lílian Cataldi Rodrigues

Ribeirão Preto

2012

## RESUMO

Rodrigues, L. C. **Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena, sobre funções de neutrófilos.** 2012. 99f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A galectina-1 (Gal-1) é uma lectina que reconhece  $\beta$ -galactosídeos e participa de vários processos biológicos, incluindo a modulação da resposta inflamatória. Dados da literatura mostram a participação desta lectina na indução da exposição de fosfatidilserina (FS - um marcador de apoptose), na geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) e na modulação quimiotática de neutrófilos. Entretanto, ainda são escassos os dados relacionados ao impacto biológico da Gal-1, exógena e endógena, sobre a biologia destas células. Neste trabalho foram avaliados, *in vitro*, alguns aspectos funcionais da interação Gal-1/neutrófilo. Determinou-se o nível de expressão da Gal-1 (*Western Blotting*) e de seu mRNA (*PCR real time*), em leucócitos humanos obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis e em células da linhagem promielocítica humana (HL-60). Leucócitos do sangue periférico e células HL-60 não expressam níveis detectáveis da proteína e também do mRNA para Gal-1. Por meio de ensaios de quimiluminescência (QL) foi possível analisar a capacidade da Gal-1 recombinante humana de induzir e modular a produção de EROs em neutrófilos humanos não ativados e ativados com fMLP (*n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*). A Gal-1 induz a produção de EROs de modo dose-dependente em neutrófilos ativados com fMLP. Entretanto, em neutrófilos não ativados esta lectina não induz o metabolismo oxidativo e, além disso, é capaz de modular negativamente a produção de EROs em resposta ao fMLP. Tanto nas células não ativadas quanto ativadas com fMLP, os efeitos da Gal-1 na produção de EROs estão parcialmente associados a sua propriedade lectínica. Na literatura ainda não há relatos sobre a interferência da Gal-1 no metabolismo oxidativo em neutrófilos ativados com repetidas doses de fMLP. Sabe-se que o tratamento sucessivo com fMLP reduz os níveis de produção de EROs por neutrófilos, no entanto, a presença de Gal-1 não interferiu neste processo. Interessantemente, neutrófilos recuperados do peritônio de camundongos Gal-1<sup>-/-</sup> liberam mais EROs em resposta ao fMLP e a Gal-1 exógena quando comparado aos neutrófilos de animais selvagens. Com base nos achados *in vitro* e sabendo que na sepse polimicrobiana o neutrófilo desempenha um papel importante, o próximo passo foi utilizar o modelo de M-CLP (sepse moderada) em camundongos destituídos (Gal-1<sup>-/-</sup>) ou não (Gal-1<sup>+/+</sup>) do gene da Gal-1. Animais Gal-1<sup>-/-</sup>, apresentam menor taxa de sobrevivência. O influxo de neutrófilos e a carga bacteriana no peritônio são maiores nos animais Gal-1<sup>-/-</sup> apesar da menor quantidade de bactérias detectadas no sangue, em relação aos animais selvagens. No pulmão, o influxo de neutrófilos é semelhante para ambos os grupos. No entanto, após a injeção intraperitoneal de 10<sup>7</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, camundongos Gal-1<sup>-/-</sup> apresentam maior atividade bactericida no lavado peritoneal e sangue, em relação aos selvagens. A participação da Gal-1 na homeostase de neutrófilos foi demonstrada *in vitro*, por citometria de fluxo (anexina-V-FITC), onde a indução de FS nos neutrófilos tratados com Gal-1 favoreceu a fagocitose destas células por macrófagos. Portanto, este conjunto de resultados sugere que a Gal-1, exógena ou endógena, pode modular funções imunológicas de neutrófilos e participar da regulação do processo inflamatório/infeccioso sistêmico. Palavras-chave: 1. Galectina-1. 2. Neutrófilos. 3. Metabolismo oxidativo. 4. Sepse Polimicrobiana.

## 1. Introdução

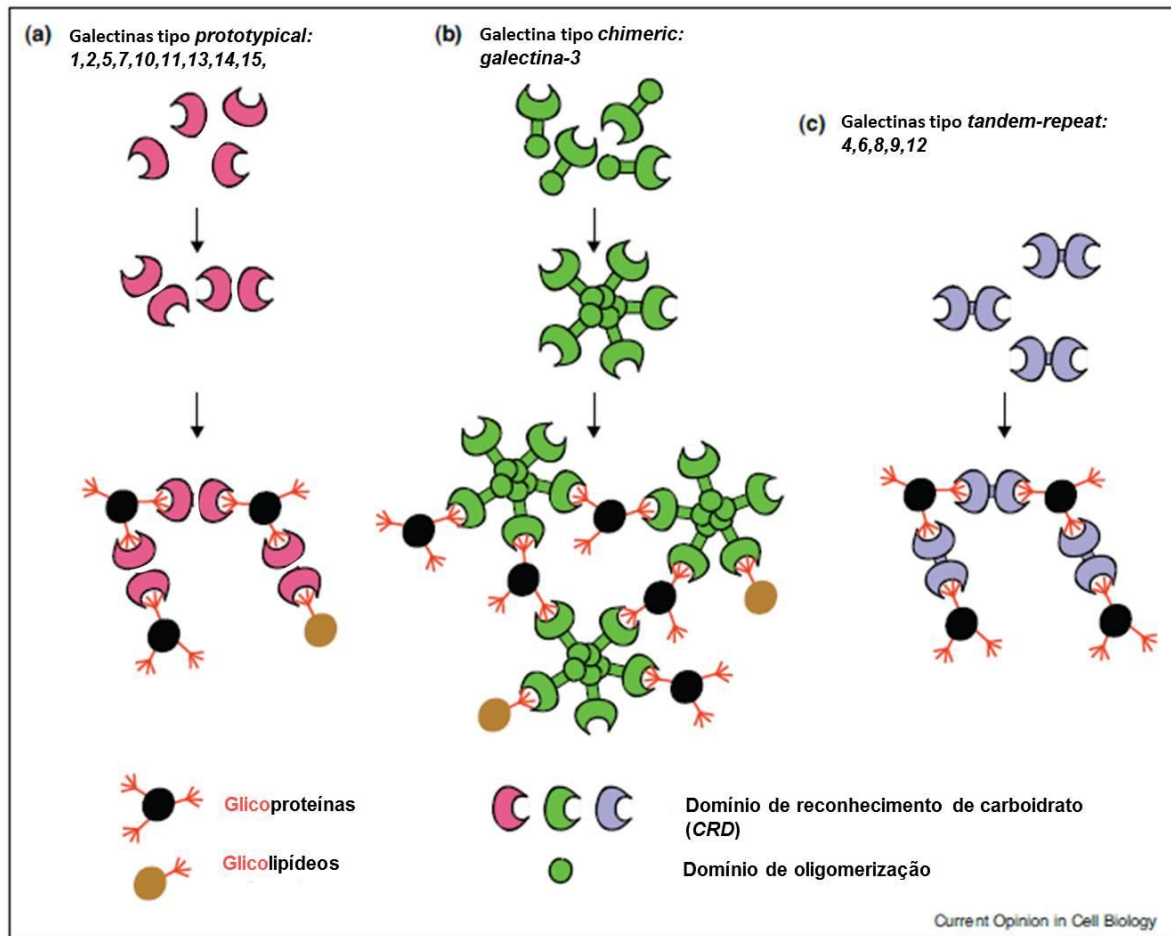
### 1.1 Lectinas: proteínas multifuncionais

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

As lectinas, animais ou vegetais, são classificadas com base na sequência de aminoácidos e na homologia estrutural de seus CRDs. As lectinas de animais são agrupadas em diferentes famílias identificadas como tipos: C (cálcio dependente), S (galectinas), I, M, L, P, R e outras. Além disso, existe uma classe de lectinas que reconhecem glicosaminoglicanos (GAG). GAGs são polissacarídeos compostos por unidades repetitivas de dissacarídeo linear, como hexosamina e hexose ou ácido hexurônico, associados a cadeias laterais de proteínas (proteoglicanos), ou são complexos de polissacarídeos livres (DRICKAMER, 1988; KILPATRICK, 2002; VARKI et al., 2009).

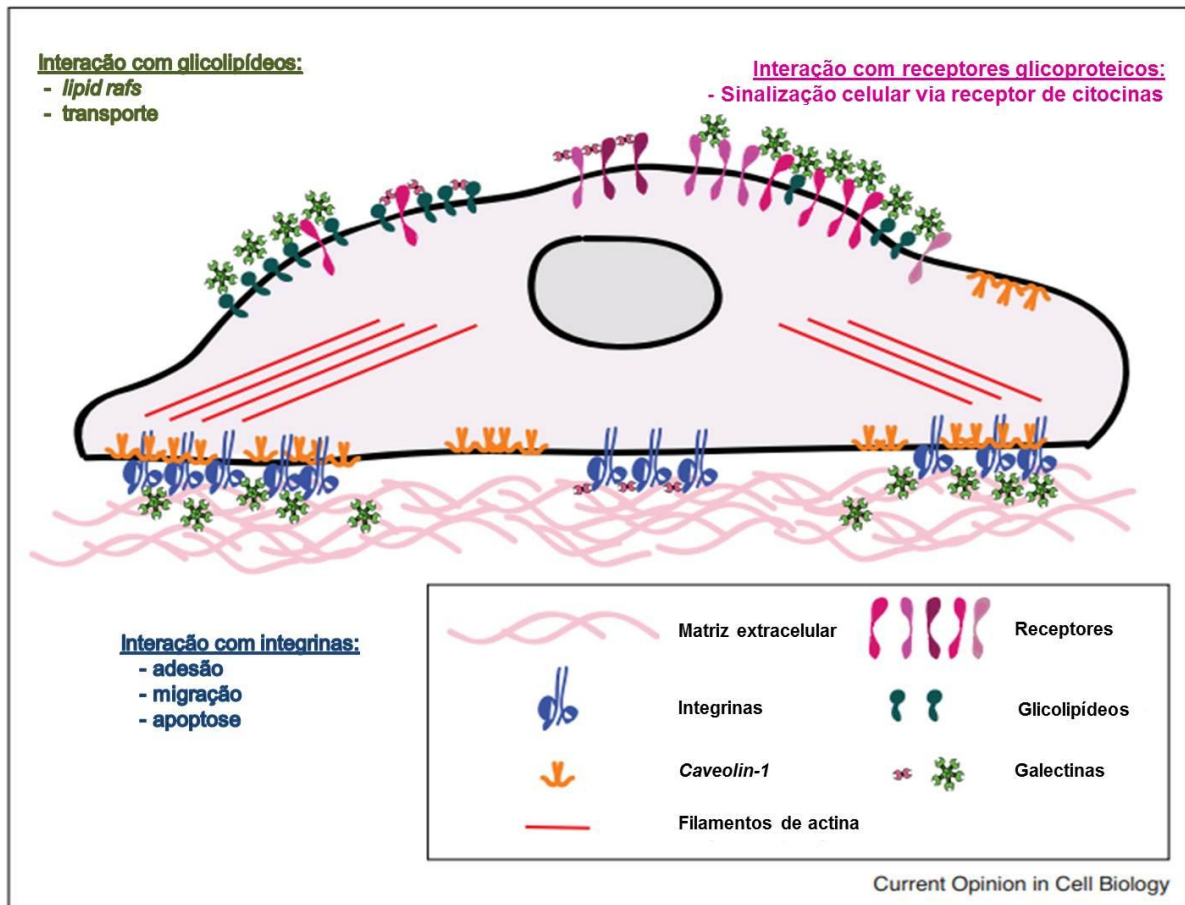
A primeira lectina de origem animal foi descrita por WATKINS & MORGAN, em 1952, a qual mostrava especificidade para o açúcar L-Fucose. O isolamento da primeira lectina de mamífero, uma lectina hepática ligante de galactose (*the galactose-specific hepatic asialoglycoprotein receptor*), ocorreu em 1974, enquanto os pesquisadores GILBERT ASHWELL e ANATOL G. MORELL buscavam estudar os mecanismos que controlam o tempo de vida de glicoproteínas na circulação sanguínea (HUDGIN et al, 1974; STOCKERT; MORELL; SCHEINBERG, 1974). Ao mesmo tempo, TEICHBERG e colaboradores (1975) realizaram o isolamento a partir de um peixe conhecido como enguia elétrica, do primeiro membro da família das lectinas  $\beta$ -galactose-específicas, a *electrolectin*, hoje denominada galectina-1 (Gal-1) (BARONDES et al., 1994).

A família das galectinas foi inicialmente classificada como tipo-S (dependente de grupos sulfidrílicos) para denotar a presença de cisteínas livres nessas moléculas e a dependência da solubilidade e atividade lectínica na manutenção de seus grupos sulfidrílicos na forma reduzida (BARONDES et al., 1994; CUMMINGS; LIU, 2009). As galectinas são proteínas solúveis, não possuem peptídeo sinal, estão confinadas em compartimentos citosólicos e são liberadas para o meio extracelular através de um mecanismo secretório não convencional (COOPER; BARONDES, 1990; SATO et al., 1993). Em mamíferos, foram descritas, até o momento, 15 galectinas, subdivididas em três categorias com base na homologia estrutural de seus CRDs e de suas sequências de aminoácidos. A figura 1 ilustra as galectinas do tipo: a) *prototypical*, que são aquelas que contêm um único CRD e formam homodímeros não covalentes; b) *chimeric*, as quais apresentam um CRD e um domínio amino-terminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina, o qual é sensível a metaloproteinases e contribui para a oligomerização dessas lectinas; c) *tandem-repeat*, polipeptídeos únicos compostos por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo ligador de 5 a 50 resíduos de aminoácidos (CUMMINGS; LIU, 2009; BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011).



**Figura 1. Classificação das galectinas de mamíferos.** As galectinas são classificadas em 3 grupos de acordo com suas características estruturais: *prototypical*, *chimeric* e *tandem repeat*. Os domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) das galectinas apresentam aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos, sendo que apenas alguns desses resíduos interagem diretamente com os carboidratos livres ou constituintes de glicolipídeos e glicoproteínas. Os CRDs das galectinas estão representados por formas elípticas em diferentes cores de acordo com cada grupo. A galectina do tipo *chimeric*, galectina-3, pode formar oligômeros, como representado pelas esferas em verde. Adaptado de BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011.

As galectinas são expressas por uma grande variedade de tipos celulares e podem tanto participar de interações célula-célula e célula-matriz extracelular quanto modular funções celulares (CAMBY et al., 2006; CUMMINGS; LIU, 2009). No espaço extracelular, a interação dessas lectinas com glicanas das superfícies de células do sistema imunológico pode, de modo interessante, promover a modulação da produção de citocinas e mediadores, adesão celular, apoptose, quimiotaxia e endocitose (CUMMINGS; LIU, 2009; LIU; RABINOVICH, 2010, BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011).



**Figura 2. Galectinas participam de vários eventos biológicos por meio da interação com componentes da superfície de células e matriz extracelular.** As galectinas interagem com integrinas e outras moléculas localizadas na matriz e no compartimento celular, regulando eventos de adesão e migração como a formação de pseudópodes, a polimerização de actina e o remodelamento de fibronectina. As interações que envolvem glicolipídeos desencadeiam processos de reorganização de micro-domínios lipídicos e transporte de proteínas através da membrana. Além disso, estas lectinas podem interagir com diferentes receptores celulares, inclusive os do tipo tirosino-quinases e receptores glicoproteicos de células T (TCR, CD3, CD7, CD43, CD45), regulando eventos de sinalização celular mediados por citocinas pró e anti-inflamatórias. O padrão de glicosilação e o estado metabólico das células são fatores determinantes para a ligação galectinas/células e consequentes eventos biológicos resultantes desta interação. Adaptado de BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011.

Já em um ambiente intracelular, as galectinas podem tanto participar de vias de sinalização e *splicing* de mRNA quanto modular algumas respostas biológicas, como apoptose, diferenciação e migração celulares. Assim, essas proteínas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resposta inflamatória, doenças autoimunes, aterosclerose, processos infecciosos e câncer (CUMMINGS; LIU, 2009; LIU; RABINOVICH, 2010).

Recentemente, as galectinas, por reconhecerem glicanas presentes em microrganismos, têm sido consideradas como uma nova classe de receptores para padrões moleculares associadas a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* - PAMPs). Ainda, por serem encontradas em tecidos danificados por ação de patógenos, são descritas como potenciais candidatas a padrões moleculares associados ao dano tecidual (*danger associated molecular patterns* - DAMPs) e, portanto, participam da montagem e desenvolvimento da resposta inata em processos infecciosos (CERRI et al., 2008; SATO et al., 2009). Nesta linha, foi descrito que a galectina-4 e a galectina-8 são capazes de interagir com bactérias que expressam carboidratos do sistema ABO humano e de induzir a morte desses microrganismos (STOWELL et al., 2010).

## 1.2 A galectina-1 (Gal-1)

A Gal-1, anteriormente chamada de lectina L14 (GU et al., 1994), é uma proteína ácida (pI 5.6), possui N-terminal acetilado, não possui peptídeo sinal e apresenta resíduos de cisteínas livres. Essa lectina apresenta uma topologia molecular do tipo *jelly-roll* composto por duas folhas- $\beta$  anti-paralelas (LOPEZ-LUCENDO et al., 2004). Os monômeros de Gal-1 possuem massa molecular aparente de ~15kDa, associam-se por meio de interações não covalentes e formam homodímeros com constante de associação de  $7\mu\text{M}$  (BARONDES et al., 1994; CHO; CUMMINGS, 1995), sendo que as formas monomérica e dimérica podem ou não apresentar as mesmas propriedades biológicas (CAMBY et al., 2006).

A Gal-1 humana é codificada pelo gene LSGALS1, de 4397 pares localizados no cromossomo 22 região q12 (CHIARIOTTI et al., 2004). O transcrito de 0,6kb resulta do *splicing* de 4 exons e codifica uma proteína de 135 aminoácidos (CHIARIOTTI et al., 2004). A Gal-1 de camundongo é



codificada pelo gene *Isgals1*, de 3451 pares de base, localizado no cromossomo 15 na região 44.9cM na citobanda E, dando origem a um transcrito de 817 pares de base, traduzido a uma proteína de 135 aminoácidos (LOHR et al., 2007). As duas proteínas possuem identidade de 88,15% e homologia de 94% (STOWELL et al., 2009).

Análise de estruturas cristais de Gal-1 ligadas a glicanas (DIAS-BARUFFI et al., 2002; LÓPEZ-LUCENDO et al., 2004), bem como estudos de ligação desta lectina com neoglicoproteínas imobilizadas (STOWELL et al., 2004) e glicoconjugados de superfície celular (PATNAIK et al., 2006), mostram que a Gal-1 reconhece resíduos de galactose terminal e que esta ligação proteína-carboidrato pode ter interferência de glicanas de diferentes complexidades estruturais e ser sensível a condições oxidantes. A expressão de galectina-1 foi observada em células epiteliais do timo (BAUM et al., 1995), em células T primadas com antígeno (BLASER et al., 1998), em macrófagos ativados (RABINOVICH et al., 1996), em células B ativadas (ZUÑIGA et al., 2001), em células endoteliais (LA et al., 2003) e em células do estroma e órgãos linfoides murinos, como o timo e linfonodo (CHIARIOTTI et al., 1999; RABINOVICH; RUBISTEIN; TOSCANO, 2002).

Além de presente no citoplasma, a Gal-1 também foi detectada no núcleo (VYAKARNAM et al., 1998). Diversas evidências indicam que a Gal-1, juntamente com galectina-3, estão envolvidas no *splicing* de pré-mRNA, uma vez que o extrato nuclear depletado de ambas as galectinas perdeu a capacidade de realizar *splicing*, e a adição de Gal-1 ou galectina-3 recombinante foi capaz de restaurar tal atividade (VYAKARNAM et al., 1997).

Foram descritos alguns receptores para Gal-1 em células T, incluindo CD2, CD7, CD43 e CD45 (PACE et al., 1999; 2000; HERNANDEZ et al., 2006), fato evidenciado pela redistribuição dessas glicoproteínas em microdomínios específicos após a incubação com Gal-1. Entretanto, o possível envolvimento de CD45 na indução de apoptose por esta lectina ainda é controverso (WALZEL et al., 1999, NGUYEN et al., 2001; FAJKA-BOJA et al., 2002), provavelmente devido às diferenças na glicosilação específica dessas glicoproteínas, que afetam a resposta de células T à Gal-1. A ligação de Gal-1 a células T inicia uma variedade de eventos de transdução de sinal, tais como ZAP-70 e ERK-2, fosforilação da tirosina de fosfolipase C $\gamma$ -1 (PC $\gamma$ -1), influxo de

cálcio, ativação de fatores de transcrição como AP-1 e NF- $\kappa$ B e redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2, importante para a fisiologia e a sobrevivência de célula T (VESPA et al., 1999; RABINOVICH et al., 2000a; TOSCANO et al., 2011).

Além disso, a Gal-1 pode promover a apoptose de células T produtoras da citocina pró-inflamatória IL-17 (T<sub>H</sub>17) e não de células T<sub>H</sub>2 produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$  (citocinas com caráter anti-inflamatório) (TOSCANO et al., 2007). Interessantemente, as células associadas a linfomas de Hodgkin podem promover o escape da resposta imunológica antitumoral, por expressarem grandes quantidades de Gal-1 (JUSZCZYNSKI et al., 2007). Segundo esses autores, a Gal-1 está envolvida neste processo de escape imunológico por favorecer a secreção de citocinas T<sub>H</sub>2 (MOTRAN et al., 2008) e a expansão de células T regulatórias do tipo CD4+, CD25+(*high*) e FOXP3+.

Diversos trabalhos também mostram a participação da Gal-1 na resposta imunológica inata e em processos inflamatórios. A Gal-1 inibe tanto a liberação do ácido araquidônico (AA) e da prostaglandina E2 no modelo de edema de pata causado pela injeção de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) de veneno de abelha (RABINOVICH et al., 2000b), quanto a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de NO sintetase induzível (iNOS) em macrófagos estimulados com LPS (CORREA et al., 2003). Nesta mesma linha, monócitos humanos tratados com essa lectina apresentam redução da fagocitose via receptores da classe Fc $\gamma$ RI e inibição da expressão de MHCII, com conseqüente redução da apresentação de antígenos a células T (BARRIONUEVO et al., 2007).

A administração *in vivo* da Gal-1 tem sido usada com sucesso na prevenção da instalação da inflamação crônica em modelos experimentais de encefalomielite autoimune (OFFNER et al., 1990), colite (SANTUCCI et al., 2003), pancreatite crônica (WANG et al., 2000) e artrite reumatoide, em que a administração de Gal-1 aboliu a resposta autoimune. Importante observar que, no último caso, o efeito terapêutico foi acompanhado por mudança de resposta de citocinas para padrão T<sub>H</sub>2 (RABINOVICH et al., 1999).

A redução na produção de IFN- $\gamma$  também foi observada em modelo de hepatite induzida por concanavalina A (Con-A) (SANTUCCI et al., 2000), uveíte autoimune experimental (TOSCANO et al., 2006) e reação de enxerto versus hospedeiro (BAUM et al., 2003). Nesta linha, camundongos deficientes de Gal-

1 produzem mais IFN- $\gamma$  e IL-17 em modelo de neuroinflamação autoimune experimental (TOSCANO et al., 2007).

Portanto, esses estudos realizados em vários modelos experimentais têm estabelecido que a Gal-1 tem atividade anti-inflamatória e imunoregulatória, estando essa modulação da resposta imunológica relacionada ao efeito benéfico do uso de Gal-1 no tratamento de diversas doenças autoimunes/inflamatórias experimentais (LIU; RABINOVICH, 2010).

### **1.3 O neutrófilo na imunidade inata**

Os neutrófilos são granulócitos produzidos e armazenados na medula óssea e liberados para o sangue periférico, onde têm uma média de vida na circulação de apenas 6 - 7 horas. Essas células representam de 50 a 70% do total de leucócitos no sangue periférico humano, são esféricas e possuem tamanho de 10 a 20 $\mu$ m de diâmetro, com núcleo segmentado constituído de cromatina purpúrea escura e densa e com de 3 a 5 lóbulos interligados (JOHNSON; VARANI; SMOLEN, 1992). Os grânulos intracelulares são classificados em primários (ou azurófilos), secundários (ou específicos), terciários (ou de gelatinase) e vesículas secretórias, cujos componentes estão relacionados à fagocitose e à morte intracelular de microrganismos (matriz rica em enzimas e peptídeos com atividade microbicidas (BORREGAARD; COWLAND, 1997). Tais grânulos são responsáveis pelo armazenamento e pela expressão de moléculas de adesão (CD18, CD66 e CD67), de receptores (TNFR1-2, CD14, MyD88, fMLPR, CD35, CD16, IgG-A-E, TLR1-2-4-6-8, CXCR-1-2-3-4 INF- $\alpha$ R1-2, IL-1-4-6-10-13-17-18), de proteínas anti-bactérias (GP91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, lisosima, mieloperoxidase, defensinas, entre outras) e de proteases (MMP25, gelatinase, colagenase, elastase, proteinase3 e cathepsinaG) (BORREGAARD; SORENSEN; THEILGAARD-MONCH, 2007; HÄGER; COWLAND; BORREGAARD, 2010).

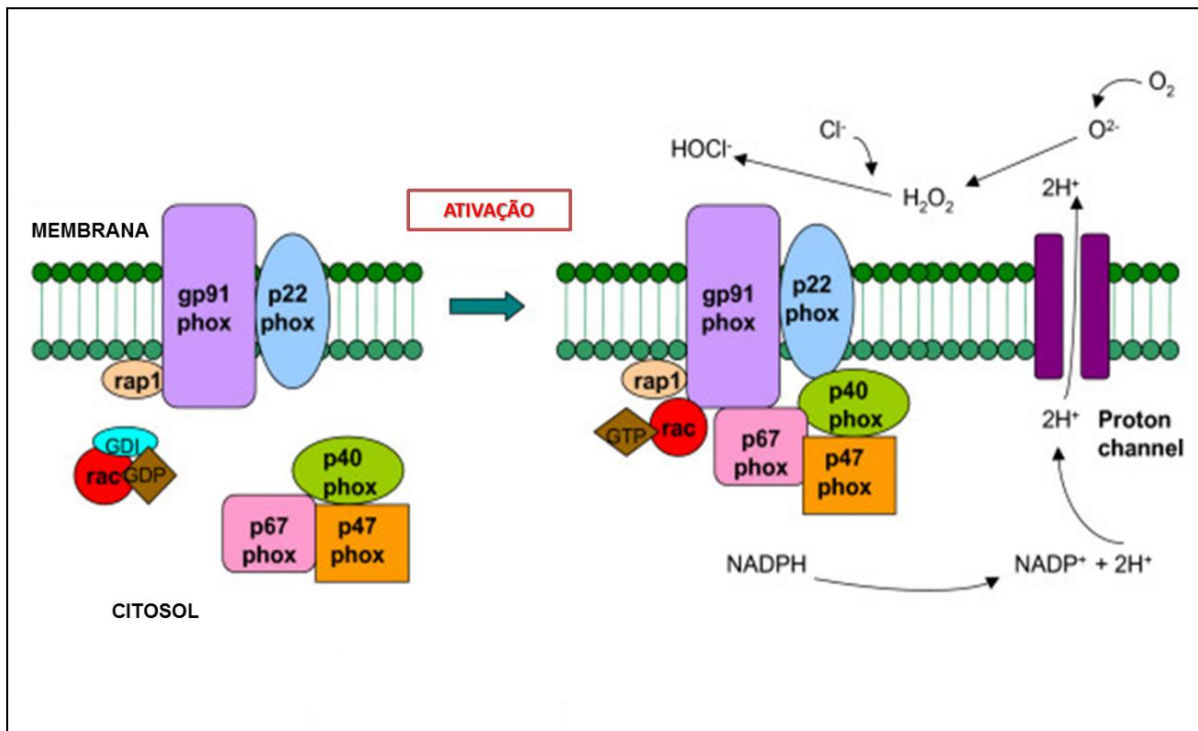
Os neutrófilos participam do sistema imunológico inato como fagócitos profissionais, contribuindo para a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogênicos (KUMAR; SHARMA, 2010). O recrutamento de neutrófilos ao foco inflamatório/infeccioso envolve uma cascata de eventos iniciada pelo contato dos leucócitos com o endotélio vascular ativado (WILLIAMS et al., 2011). A captura e o rolamento dos neutrófilos são mediados primeiramente

pela ligação de moléculas de baixa afinidade, presentes no endotélio (P- e E-selectinas), com ligantes presentes na superfície dos neutrófilos (PSGL-1-ligante de P-selectina, ESL-1-ligante de E-selectina e CD44). A presença de quimiocinas, bem como a ligação com seus respectivos alvos nestas células, modula positivamente a expressão de moléculas de alta afinidade como as integrinas ( $\beta 2$  – CD18). As integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18) interagem com ICAMs (moléculas de adesão expressas no endotélio), diminuindo o rolamento dos neutrófilos para que ocorra transmigração endotelial. Várias proteínas trans-membranares, incluindo PECAM-1, ICAM-1, VE-caderina, JAMs e CD99, também participam deste processo de diapedese (WILLIAMS et al., 2011).

Uma vez no local da inflamação, os neutrófilos atuam através de mecanismos independentes e dependentes de oxigênio, os quais compreendem a fagocitose, a desgranulação, a produção de mediadores anti e pró-inflamatórios (IL-1, IL-6 e IL-8, ativador de plasminogênio, TNF- $\alpha$ ), além de poderem atuar como apresentadores de antígenos para linfócitos T (MAYER-SCHOLL et al., 2004) A destruição de patógenos no interior do fagossoma de modo independente do oxigênio ocorre com a fusão de grânulos, seguida da liberação de substâncias microbicidas, tais como defensinas, lisozimas e proteases. A elastase neutrofílica é uma enzima efetora chave no sistema imunológico inato, pois apresenta uma potente atividade contra fungos e bactérias, principalmente Gram-negativas (BRINKMANN, 2004; PHAM, 2006).

Além dos mecanismos microbicidas independentes de oxigênio, a fagocitose é acompanhada de um conjunto de alterações metabólicas nas células fagocíticas, denominado *burst*, ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa (BABIOR, 1999). A produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) pode ser desencadeada quando as células fagocíticas entram em contato com estímulos como PMA (*Phorbol Myristate Acetate*), fMLP (*n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*), AA, Con-A, ionóforos, complexos imunes e ainda partículas antigênicas (zimozan, látex) opsonizadas com anticorpos e componentes do sistema complemento (BROWN, 1995). O metabolismo oxidativo dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático chamado NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reduzida) oxidase (BABIOR, 2002). O complexo é formado por componentes existentes no citosol

[p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>(*phox=phagocyte*) e Rac2] e subunidades encontradas na membrana plasmática, na membrana dos grânulos específicos, de gelatinase e vesículas secretórias (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> e Rap1). As duas subunidades gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup> ocorrem como uma flavohemeproteína conhecida como citocromo b558, cuja função é transferir elétrons através da membrana (tanto para fora das células quanto dentro dos fagossomas) para o oxigênio molecular, gerando o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). A separação desses dois grupos de componentes da NADPH oxidase e a distribuição entre compartimentos celulares distintos permitem que a oxidase esteja inativa enquanto a célula não for ativada (BABIOR, 2002).



**Figura 3. Ativação do complexo NADPH oxidase.** Os componentes citosólicos  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  e  $p67^{phox}$  estão complexados, com exceção do Rac2, que, ligado ao GDP, atua como inibidor da translocação. O processo de ativação envolve fosforilação da  $p47$  e conseqüente translocação do complexo citoplasmático para a membrana, formando o complexo ativo. O NADPH doa seus elétrons, os quais são transferidos para o oxigênio molecular através das subunidades  $gp91^{phox}$  e  $p22^{phox}$ , gerando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O  $O_2^-$  é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que, por sua vez, forma outros radicais livres do oxigênio por meio de reações químicas e enzimáticas. Adaptado de ASSARI, 2006.

A atividade da NADPH oxidase foi verificada em neutrófilos humanos de pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC). A DGC é autossômica recessiva e se caracteriza por um defeito genético no componente citosólico da NADPH oxidase, p<sup>67</sup> e p<sup>47</sup> respectivamente, caracterizando as diferentes formas dessa doença (ROOS et al., 1996).

A produção de EROs em neutrófilos ativados pode provocar, na superfície dessas células, a exposição de fosfatidilserina (FS), um componente fosfolipídico normalmente mantido no lado citosólico das membranas celulares e que se torna exposto através de mecanismos de ativação celular e apoptose (ARROYO et al., 2002). Entretanto, FADEEL e colaboradores (1998) demonstraram a existência de dois mecanismos: um dependente da produção de EROs e outro não, responsáveis pela indução de exposição de FS na superfície de neutrófilos e sua consequente eliminação dos tecidos por fagocitose.

Em um estudo que utilizou células diferenciadas HL-60 (linhagem pró-mielocítica humana) e neutrófilos de sadios, essas células confirmaram que o tratamento com ativadores da NADPH oxidase como PMA e zimosan é capaz de disparar a produção de EROs, e o bloqueio da atividade enzimática com DPI (Iodoniodifenileno) mostrou a inibição da explosão respiratória e a falha na exposição da FS na superfície dessas células (ARROYO et al., 2002). O DPI atua no bloqueio da atividade enzimática por captura do elétron no momento da transferência do elétron para o citocromo b, no momento da formação do complexo.

BENGTSONN e colaboradores (2006) demonstraram ainda que os processos de polimerização e despolimerização do citoesqueleto de actina contribuem para regulação e montagem do complexo NADPH oxidase presente nos neutrófilos.

Na literatura, portanto, ainda são conflitantes os achados referentes à correlação entre apoptose e geração de espécies reativas do oxigênio, bem como os processos que incluem a participação de marcadores constitutivos do reconhecimento celular nos processos de fagocitose e/ou apoptose envolvendo a homeostase de células do sistema imune.

#### **1.4 Participação da Gal-1 nas funções de neutrófilos**

Dados da literatura têm mostrado a ação da Gal-1 sobre alguns aspectos funcionais dos neutrófilos. TIMOSHENKO e colaboradores (1993) demonstraram que Gal-1 originada da placenta humana induz a liberação de superóxido em neutrófilos de pacientes com determinados tipos de tumores e que Gal-1 humana, proveniente do baço, também induz o mesmo efeito em neutrófilos homólogos, na presença de citocalasina B (CB) (ELOLA; FLINK, 1999). De modo interessante, há uma correlação positiva entre a inibição da polimerização do citoesqueleto de actina induzida por CB e o aumento da atividade da NADPH oxidase (COHEN; CHOVANIEC; WILSON, 1982). ALMKVIST e colaboradores (2002) mostraram que a Gal-1 se liga, principalmente, à superfície de neutrófilos ativados (membrana dos grânulos de vesículas secretórias e de grânulos de gelatinase). Em neutrófilos ativados e em células de linhagem pró-mielocítica (HL60), foi descrito que esta lectina é capaz de ativar a enzima NADPH oxidase, de induzir expressão de FS e de promover a fagocitose dessas células por macrófagos sem promover fragmentação do DNA, mudanças no potencial da membrana mitocondrial ou ativação de caspases. Desta forma, estes autores sugerem que a Gal-1 participa da homeostase de neutrófilos independentemente da apoptose (ALMKVIST et al., 2002; DIAS-BARUFFI et al., 2003; KARMAKAR; CUMMINGS; MCEVER, 2005; STOWELL et al., 2007).

A explosão respiratória e a exposição de FS em neutrófilos induzida por Gal-1 ocorrem em neutrófilos ativados com fMLP, o que parece estar associado à capacidade de fMLP provocar alterações na superfície dos neutrófilos (DIAS-BARUFFI et al., 2003; ALMKVIST et al., 2002). Além disso, neutrófilos humanos exsudados apresentam maior número de ligantes de Gal-1 em comparação aos neutrófilos do sangue periférico (ALMKVIST et al., 2002). ELOLA e colaboradores (2005) mostraram que o tratamento com Gal-1, proveniente do baço de suínos, permitiu a desgranulação dos neutrófilos na presença de citocalasina B. Ainda, em neutrófilos humanos, de acordo com ALMKVIST e colaboradores (2002), a Gal-1 é capaz de induzir a liberação de MPO (mieloperoxidase) e gelatinase.

Em modelo experimental de inflamação *in vitro* e *in vivo*, a Gal-1 inibiu a migração de neutrófilos induzida por mediadores inflamatórios como a IL-1 $\beta$ , a



IL-8 e o TNF- $\alpha$  (LA et al., 2003). Nesta linha, mostrou-se que essa lectina inibe o edema, o extravasamento de neutrófilos e a desgranulação de mastócitos (RABINOVICH et al., 2000b).

A interação do neutrófilo com o endotélio promove a expressão de outra lectina: a galectina-3. GIL e colaboradores (2006b) sugeriram um possível papel destas lectinas na modulação da resposta inflamatória. Estes pesquisadores descrevem também que a Gal-1, diferentemente da galectina-3, pode apresentar uma característica anti-inflamatória, pois a primeira é capaz de modular negativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de roedores (GIL et al., 2006a). COOPER e colaboradores (2008) demonstraram *in vitro* que células endoteliais nocauteadas para o gene para Gal-1 promovem um aumento no extravasamento de neutrófilos, sugerindo a participação desta lectina na diminuição da quimiotaxia e no rolamento e na adesão destes leucócitos ao endotélio ativado.

Nesta linha, outros autores demonstraram que o pré-tratamento com Gal-1 no modelo animal de peritonite induzida por zimozan resultou na diminuição da expressão de moléculas de adesão (L-selectina e  $\beta$ 2-integrina) na superfície de neutrófilos. Além disso, houve também uma diminuição nos níveis dos mediadores TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no lavado peritoneal destes camundongos (GIL; GULLO; OLIANI, 2010).

Na maioria das células não ativadas por estímulos pró-inflamatórios, o NF- $\kappa$ B está presente no citoplasma e complexado com a proteína inibitória I $\kappa$ B $\alpha$  (GHOSH; KARIN, 2002). Mediadores pró-inflamatórios, como o LPS e o TNF- $\alpha$ , promovem a fosforilação da proteína inibitória citoplasmática I $\kappa$ B $\alpha$ , e este processo libera o NF- $\kappa$ B do complexo inibitório (NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$ ), permitindo sua translocação para o núcleo e a sua interação com regiões gênicas promotoras responsivas ao NF- $\kappa$ B (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996). O fator nuclear de transcrição NF- $\kappa$ B regula a expressão de vários genes pró-inflamatórios como moléculas de adesão (ICAM-1 e V-CAM-1), fatores quimiotáticos (IL-8 dentre outros) e citocinas (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), podendo participar da patogênese de diversas doenças associadas ao descontrole do processo inflamatório (BARNES; KARIN, 1997; STRNAD; BURKE, 2007). A ativação NF- $\kappa$ B aumenta a expressão de Gal-1 em células T. Por outro lado, a Gal-1 exógena pode modular negativamente a ativação NF- $\kappa$ B através da inibição da degradação de

seu inibidor I $\kappa$ B- $\alpha$  (TOSCANO et al., 2011). Estes autores sugerem, portanto, que a Gal-1 participa de um processo auto-regulado através do qual o fator transcricional NF- $\kappa$ B aumenta a expressão de Gal-1, o que diminui os eventos de sinalização a ele relacionados.

Embora os mecanismos que controlam a homeostase e as funções de neutrófilos não estejam bem definidos, podemos observar, com base na literatura, que a Gal-1 tem importante participação neste processo.

### **1.5 Participação do neutrófilo na patogenia da sepse**

A sepse é resultado de uma complexa resposta imunológica sistêmica deflagrada por um agente infeccioso. Esta síndrome complexa ocorre quando os mecanismos de defesa inicial do hospedeiro são incapazes de conter a infecção primária, resultando em um processo inflamatório e infeccioso descontrolado, que conduz a quadros de hipotensão, coagulopatia, falha múltipla de órgãos e até a morte (COHEN, 2002).

As características da resposta imunológica inata são cruciais na evolução da sepse. Este processo é mediado por patógenos ou seus produtos, identificados como PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), que são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* – PRR), por padrões moleculares associados ao dano (*danger associated molecular patterns* - DAMP) e por alarminas (CASTELLHEIM et al., 2009). Além disso, evidências recentes têm mostrado que ácidos nucleicos oriundos de patógenos ou de células hospedeiras danificadas participam da modulação da cascata de ativação intracelular (BLEIBLO et al., 2012). A ativação resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas do oxigênio, que, em altas concentrações, conduzem ao choque séptico e à morte (JEAN-BAPTISTE, 2007). Neste contexto, a Gal-1 pode estar envolvida na resolução da sepse por ser descrita, recentemente, como uma molécula associada ao dano celular (DAMP) e, ainda, por atuar como receptora de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (SATO et al., 2009). Esta lectina também participa da modulação negativa de citocinas inflamatórias através da inibição da degradação do inibidor de NF- $\kappa$ B, o I $\kappa$ B- $\alpha$  (TOSCANO et al., 2011). Uma vez liberado, o NF- $\kappa$ B dispara a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), quimiocinas (IL-8,

MIP-1 $\alpha$ , MIP-2), moléculas de adesão (E-selectinas P-selectinas, ICAM-1, V-CAM), iNOS, COX-2, fosfolipase A<sub>2</sub>, AA e proteínas de fase aguda (CASTELLHEIM et al., 2009). Dados da literatura mostram ainda que a Gal-1 induz a produção de espécies reativas do oxigênio em neutrófilos ativados, podendo contribuir para o *clearance* de bactérias. Neste contexto, galectinas 4 e 8 são capazes de reconhecer e eliminar bactérias que expressam carboidratos do sistema ABO humano (STOWELL et al., 2010).

O recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso é primordial para a eliminação de bactérias patogênicas, devido à capacidade destas células de fagocitar e liberar enzimas líticas, radicais livres do oxigênio e do nitrogênio e polipeptídeos antimicrobianos (SEGAL, 2005). Animais submetidos à sepse não grave são capazes de controlar a infecção, apresentando uma efetiva migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Em contrapartida, animais submetidos à sepse grave, pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (*CLP - Cecal ligation and puncture*), apresentam comprometimento da migração para o foco primário, resultando no descontrole da infecção (ALVES-FILHO et al., 2006, 2008). A falência na migração dos neutrófilos foi também observada em pacientes sépticos, e, junto a este fenômeno, foi relatada uma menor resposta destas células diante de agentes quimiotáticos como CXCL8, fMLP e LTB<sub>4</sub> (TAVARES-MURTA et al., 2002).

O papel do neutrófilo, no entanto, nem sempre é benéfico, podendo ser nocivo no processo de resolução da sepse, pois estas células, quando não migram para o foco primário, acabam sendo sequestradas em órgãos secundários distantes do local da infecção, como pulmão, fígado, rins e coração, conduzindo para lesão tecidual ou perda da função orgânica (COHEN, 2002; ABRAHAM; SINGER, 2007). Estes eventos de migração contribuem para a patogênese da sepse e estão diretamente relacionados com a elevada taxa de mortalidade dos indivíduos acometidos (MULLER KOBOLD et al., 2000; PINHEIRO da SILVA F; SORIANO, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento deste projeto buscou o melhor entendimento da participação da Gal-1 nas funções de neutrófilos relacionadas ao metabolismo oxidativo, na homeostase destas células e na patogenia da sepse, podendo assim gerar subsídios para o desenvolvimento de estratégias

terapêuticas baseadas no reconhecimento de carboidratos aplicáveis a diversas patologias e associadas ao processo inflamatório.

## 2. Conclusão

Neste trabalho foi possível demonstrar que a Gal-1, exógena e endógena, pode regular positiva ou negativamente a produção de EROs por neutrófilos em resposta ao fMLP por meio de um mecanismo dependente do reconhecimento de carboidrato. Ainda, sugerimos que as propriedades imunoregulatórias da Gal-1 podem ser importantes na resolução de processos infecciosos e/ou nas lesões teciduais provocadas por infecções bacterianas. Portanto, a continuidade deste projeto irá contribuir para o entendimento do papel da Gal-1 na modulação da resposta imunológica no modelo de sepse moderada, além de elucidar o impacto biológico desta lectina na homeostase de neutrófilos e gerar subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de outras patologias infecciosas.

## 3. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Critical care medicine**, New York, Kolen, v.35, n.10, Oct, p.2408-16, 2007.

ALMKVIST, J.; DAHLGREN, C.; LEFFLER, H.; KARLSSON, A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. **Journal of immunology**, Baltimore, v.168, n.8, p.4034-41, 2002.

ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F.Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical care medicine**, New York, Kolen, Feb; 34 (2), p.461-70, 2006.

ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, Augusta, GA, v.30, Suppl 1, Oct, p.3-9, 2008.

ARROYO, A.; MODRIANSKY, M.; SERINKAN, F.B.; BELLO, R.I.; MATSURA, T.; JIANG, J.; TYURIN, V.A.; TYURINA, Y.Y.; FADEEL, B.; KAGAN, V.E. NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.20, p.277, n.51, p.499 65-75, 2002.

ASSARI T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. **Medical immunology**, London, Sep 21; 5:4, 2006.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, N.Y., Mar 1; 93 (5), p.1464-76, 1999.

BABIOR, B.M. The leukocyte NADPH oxidase. **The Israel Medical Association journal**, Ramat Gan, Israel, Nov; 4 (11), p.1023-4, 2002.

BAEUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, Massachusetts, Oct 4; 87 (1), p.13-20, 1996.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **The New England journal of medicine**, Apr 10; 336 (15), p.1066-71, 1997.

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

BARRIONUEVO, P.; BEIGIER-BOMPADRE, M.; ILARREGUI, J.M.; TOSCANO, M.A.; BIANCO, G.A.; ISTURIZ, M.A.; RABINOVICH, G.A. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. **Journal of immunology**, Baltimore, Jan 1; n.178 (1), p.436-45, 2007.

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

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

BENJAMIM, C.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, Jul; 182 (1), p.214-23, 2000.

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

BLEIBLO, F.; MICHAEL, P.; BRABANT, D.; RAMANA, C.V.; TAI, T.; SALEH, M.; PARRILLO, J.E.; KUMAR, A. The role of immunostimulatory nucleic acids in septic shock. **International journal of clinical and experimental medicine**, Madison, WI, v.5 (1), p.1-23, 2012.

BLOIS SM, ILARREGUI JM, TOMETTEN M, GARCIA M, ORSAL AS, CORDO-RUSSO R, TOSCANO MA, BIANCO GA, KOBELT P, HANDJISKI B, TIRADO I, MARKERT UR, KLAPP BF, POIRIER F, SZEKERES-BARTHO J, RABINOVICH GA, ARCK PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. **Nature medicine**, New York, Dec; 13 (12), p.1450-7, 2007.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, New York, N. Y., May 15; 89 (10), p.3503-21, 1997.

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

BOSCHER, C.; DENNIS, J.W.; NABI, I.R. Glycosylation, galectins and cellular signaling. **Current opinion in cell biology**, Philadelphia, PA, Aug; 23 (4), p.383-92, 2011.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D.S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, New York, N.Y, Mar 5; 303 (5663), p.1532-5, 2004.

BROWN, E.J. Phagocytosis. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Cambridge, UK, Feb; 17 (2), p. 109-17, 1995.

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

CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O.L.; ESPEVIK, T.; HARBOE, M.; MOLLNES, T.E. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, Jun; 69 (6), p.479-91, 2009.

CERRI DG, RODRIGUES LC, STOWELL SR, ARAUJO DD, COELHO MC, OLIVEIRA SR, BIZARIO JC, CUMMINGS RD, DIAS-BARUFFI M, COSTA MC. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. **Glycobiology**, Oxford, New York, Nov:18 (11), p.842-50, 2008.

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

CHO, M.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270 (10), p.5207-121995.

CLEMENTS, M.K.; SIEMSEN, D.W.; SWAIN, S.D.; HANSON, A.J.; NELSON-OVERTON, L.K.; ROHN, T.T.; QUINN, M.T. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. **Journal of leukocyte biology**, New York, Mar; 73 (3), p.344-55, 2003.

COHEN, H.J.; CHOVANIEC, M.E.; WILSON, M.K.; NEWBURGER, P.E. Con-A stimulated superoxide production by granulocytes: reversible activation of NADPH-oxidase. **Blood**, Oxford, New York, v.60, p.1188-1194, 1982.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, London, v.420, p.885-891, 2002.

COOPER, D.; NORLING, L.V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **Journal of leukocyte biology**, New York, Jun; 83 (6), p.1459-66, 2008.

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

CORREA, S.G.; SOTOMAYOR, C.E.; AOKI, M.P.; MALDONADO, C.A.; RABINOVICH, G.A. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, Oxford, New York, Feb; 13 (2), p.119-28, 2003.

CUMMINGS, R.D.; LIU, F.T. GALECTINS, CHAPTER 33. IN: VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J.D.; FREEZE, H.H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C.R.; HART, G.W.; ETZLER, M.E.; EDITORS. **Essentials of Glycobiology**, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., New York, 2009.

DIAS-BARUFFI, M.; BOCHKAREVA, E.; ROGERS, K.; STOWELL, S.; BOCHKAREV, A.; CUMMINGS, R.D. Crystal structures of human galectin-1

with low molecular weight ligands at 1.6-1.9 Å, and analysis of the ligand binding affinity to galectin-1 determined by isothermal titration calorimetry. **Glycobiology**, Oxford, New York, v.12 (10), p.701-701, 2002.

DIAS-BARUFFI M, STOWELL SR, SONG SC, ARTHUR CM, CHO M, RODRIGUES LC, MONTES MA, ROSSI MA, JAMES JA, MCEVER RP, CUMMINGS RD. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. **Glycobiology**, Oxford, New York, May; 20 (5), p.507-20, 2010.

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

DINARELLO, C.A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, Chicago, Dec; 112 (6 Suppl), p.321S-329S, 1997.

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

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.263, p.9557-9560, 1988.

DROST, E.M.; KASSABIAN, G.; MEISELMAN, H.J.; GELMONT, D.; FISHER, T.C. Increased rigidity and priming of polymorphonuclear leukocytes in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, Jun; 159 (6), p.1696-702, 1999.

ELOLA, M. T.; FINK, N.E. Galectin-1 can stimulate superoxide production in human neutrophils [on line]. *Electr. Lectin J. Lectin Biol. Biochem. Clin. Biochem.* 13. Available at: <http://www.plab.ku.dk/tcbh/Lectins13/ElolaFink/paper.html>, 1999.

ELOLA, M.T.; CHIESA, M.E.; FINK, N.E. Activation of oxidative burst and degranulation of porcine neutrophils by a homologous spleen galectin-1 compared to N-formyl-L-methionyl-L leucyl-L-phenylalanine and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, May; 141 (1), p.23-31, 2005.

FADEEL, B.; AHLIN, A.; HENTER, J.I.; ORRENIUS, S.; HAMPTON, M.B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen



species. **Animal blood groups and biochemical genetics**, New York, N.Y., v.92, p.4808–18, 1998.

FAJKA-BOJA, R.; SZEMES, M.; ION, G.; LÉGRÁDI, A.; CARON, M.; MONOSTORI, E. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. **Immunology letters**, Amsterdam, Jun 3; 82 (1-2), p.149-54, 2002.

FISCHER C, SANCHEZ-RUDERISCH H, WELZEL M, WIEDENMANN B, SAKAI T, ANDRÉ S, GABIUS HJ, KHACHIGIAN L, DETJEN KM, ROSEWICZ S. Galectin-1 interacts with the  $\alpha_5\beta_1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, Nov 4; 280 (44), p.37266-77, 2005.

FUHLER GM, BLOM NR, COFFER PJ, DRAYER AL, VELLENGA E. The reduced GM-CSF priming of ROS production in granulocytes from patients with myelodysplasia is associated with an impaired lipid raft formation. **Journal of leukocyte biology**, New York, Feb; 81 (2), p.449-57, 2007.

FORSMAN H, SALOMONSSON E, ONNHEIM K, KARLSSON J, BJÖRSTAD A, LEFFLER H, BYLUND J, KARLSSON A, DAHLGREN C. The beta-galactoside binding immunomodulatory lectin galectin-3 reverses the desensitized state induced in neutrophils by the chemotactic peptide f-Met-Leu-Phe: role of reactive oxygen species generated by the NADPH-oxidase and inactivation of the agonist. **Glycobiology**, New York, Nov; 18 (11), p.905-12, 2008.

FRY DE. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. **The American surgeon**, Atlanta Ga, Jan; 78 (1), p.1-8, 2012.

GARÍN MI, CHU CC, GOLSHAYAN D, CERNUDA-MOROLLÓN E, WAIT R, LECHLER RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. **Blood**, New, York, Mar 1; 109 (5), p.2058-65, 2007.

GARNER OB, AGUILAR HC, FULCHER JA, LEVRONEY EL, HARRISON R, WRIGHT L, ROBINSON LR, ASPERICUETA V, PANICO M, HASLAM SM, MORRIS HR, DELL A, LEE B, BAUM LG. Endothelial galectin-1 binds to specific glycans on nipah virus fusion protein and inhibits maturation, mobility, and function to block syncytia formation. **PLoS pathogens**, San Francisco, CA, Jul 15; 6(7), p.e10009932010, 2010.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, Cambridge, Apr; 109 Suppl: S81-96, 2002.

GIL, C.D.; COOPER, D.; ROSIGNOLI, G.; PERRETTI, M.; OLIANI, S.M. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflammation Reserach**, Basel, v.55, n.3, p.99-107, 2006a.

GIL, C.D.; GULLO, C.E.; OLIANI, S.M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **International journal of clinical and experimental pathology**, Madison, WI, Dec 20; 4 (1), p.74-84, 2010.

GIL, C.D.; LA, M.; PERRETTI, M.; OLIANI, S.M. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell biology international**, London, UK, v.30, n.4, p.338-44, 2006b.

GORUDKO IV, MUKHORTAVA AV, CARAHER B, REN M, CHERENKEVICH SN, KELLY GM, TIMOSHENKO AV. Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. **Archives of biochemistry and biophysics**, Dec 15; 516 (2), p.173-81, 2011.

GU, M.; WANG, W.; SONG, W.K.; COOPER, D.N.; KAUFMAN, S.J. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. **Journal of cell science**, London, Jan;107 ( Pt 1), p.175-81, 1994.

HÄGER, M.; COWLAND, J.B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of internal medicine**, Oxford, Jul; 268 (1), p.25-34, 2010.

HALLETT, M.B.; LLOYDS, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. **Immunology today**, Amsterdam, Jun; 16 (6), p.264-8, 1995.

HERNANDEZ, J.D.; NGUYEN, J.T.; HE, J.; WANG, W.; ARDMAN, B.; GREEN, J.M.; FUKUDA, M., BAUM, L.G. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. **Journal of immunology**, Baltimore, Oct 15; 177 (8), p.5328-36, 2006.

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

IZUISHI K, TSUNG A, JEYABALAN G, CRITCHLOW ND, LI J, TRACEY KJ, DEMARCO RA, LOTZE MT, FINK MP, GELLER DA, BILLIAR TR. Cutting edge: high-mobility group box 1 preconditioning protects against liver ischemia-

reperfusion injury. **Journal of immunology**, Baltimore, Jun 15; 176 (12), p.7154-8, 2006.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **Journal of intensive care medicine**, Boston, MA, Mar-Apr; 22 (2), p.63-72, 2007.

JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, New York, NY, v. 57:1, p. 46, 1992.

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

KARLSSON A, FOLLIN P, LEFFLER H, DAHLGREN C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. **Blood**, New York, May 1; 91 (9), p.3430-8, 1998.

KARMAKAR, S.; CUMMINGS, R.D.; MCEVER, R.P. Contributions of Ca<sup>2+</sup> to galectin-1-induced exposure of phosphatidylserine on activated neutrophils. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v.31, p.28623-31, 2005.

KASTEN KR, TSCHÖP J, ADEDIRAN SG, HILDEMAN DA, CALDWELL CC. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. **Shock**, Augusta, GA, Oct; 34 (4), p.327-36, 2010.

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

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International immunopharmacology**, Amsterdam; New York, Nov; 10 (11), p.1325-34, 2010.

KURIHARA D, UENO M, TANAKA T, YAMASHITA T. Expression of galectin-1 in immune cells and glial cells after spinal cord injury. **Neuroscience research**, New York, Mar; 66 (3), p.265-70, 2012.

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

LI Y, KOMAI-KOMA M, GILCHRIST DS, HSU DK, LIU FT, SPRINGALL T, XU D. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. **Journal of immunology**, Baltimore, Aug 15; 181(4), p.2781-2789, 2008.

LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1183, p.158-82, 2010.

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

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

MANSON J, THIEMERMANN C, BROHI K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. **The British journal of surgery**, Bristol, England, Jan; 99 Suppl 1:12-20, 2012.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current opinion in microbiology**, London; New York, Feb;7 (1):62-6, 2004.

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

MUGLIA C, MERCER N, TOSCANO MA, SCHATTNER M, POZNER R, CERLIANI JP, GOBBI RP, RABINOVICH GA, DOCENA GH. The glycan-binding protein galectin-1 controls survival of epithelial cells along the crypt-villus axis of small intestine. **Cell death & disease**, London, May 26; 2:e163, 2011.

MULLER KOBOLD, A.C.; TULLEKEN, J.E.; ZIJLSTRA, J.G.; SLUITER, W.; HERMANS, J.; KALLENBERG, C.G.; TERVAERT, J.W. Leukocyte activation in sepsis: correlations with disease state and mortality. **Intensive care medicine**, Berlin, New York, v.26, p.883–892, 2000.

NGUYEN, J.T.; EVANS, D.P.; GALVAN, M.; PACE, K.E.; LEITENBERG, D.; BUI, T.N.; BAUM, L.G. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. **Journal of immunology**, Baltimore, Nov 15; 167 (10), p.5697-707, 2001.

OCUIN LM, ZUBIN M. BAMBOAT, VINOD P. BALACHANDRAN, MICHAEL J. CAVNAR, HEBROON OBAID, GEORGE PLITAS, AND RONALD P. DEMATTEO. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. **Journal of leukocyte biology**, New York, March; 89 (3), p.423–432, 2011.

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

OUELLET M, MERCIER S, PELLETIER I, BOUNOU S, ROY J, HIRABAYASHI J, SATO S, TREMBLAY MJ. Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. **Journal of immunology**, Baltimore, Apr 1; 174 (7):4120-6, 2005.

PACE, K.E.; HAHN, H.P.; PANG, M.; NGUYEN, J.T.; BAUM, L.G. CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. **Journal of immunology**, Baltimore, v.165 (5), p.2331-2334, 2000.

PACE, K.E.; LEE, C.; STEWART, P.L.; BAUM, L.G. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1, **Journal of immunological methods**, Baltimore, v.163, p.3801-11, 1999.

PACLIK D, LOHSE K, WIEDENMANN B, DIGNASS AU, STURM A. Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. **Inflammatory bowel diseases**, New York, NY, Oct; 14 (10), p. 1366-72, 2008.

PANARO, M.A.; MITOLO, V. Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, New York, N.Y., Aug; 21 (3), p.397-419, 1999.

PATNAIK, S.K.; POTVIN, B.; CARLSSON, S.; STURM, D.; LEFFLER, H.; STANLEY, P. Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. **Glycobiology**, Oxford, New York, Apr; 16 (4), p. 305-17, 2006.

PHAM, C.T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature reviews. Immunology**, London, UK., Jul; 6 (7), p.541-50, 2006.

PICCININI AM, MIDWOOD KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators of inflammation**, Oxford, UK, pii: 672395, 2010.

PINHEIRO da SILVA, F.; SORIANO, F.G. Neutrophils recruitment during sepsis: critical points and crossroads. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, Fla., v.14, p.4464–4476, 2009.

PRIOR IA, MUNCKE C, PARTON RG, HANCOCK JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. **The Journal of cell biology**, New York, Jan 20; 160 (2), p.165-70, 2003.

RABINOVICH GA, TOSCANO MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, London, UK, v.9, p. 338–352, 2009.

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

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

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

RABINOVICH, G.A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M.A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, Sep 19; 1572 (2-3), p.274-84, 2002.

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

RAJASAGI NK, SURYAWANSHI A, SEHRAWAT S, REDDY PB, MULIK S, HIRASHIMA M, ROUSE BT. Galectin-1 reduces the severity of herpes simplex

virus-induced ocular immunopathological lesions. **Journal of immunology**, Baltimore, May 1; 188 (9), p.4631-43, 2012.

ROOS, D.; DE BOER, M.; KURIBAYASHI, F.; MEISCHL, C.; WEENING, R.S.; SEGAL, A.W.; AHLIN, A.; NEMET, K.; HOSSLE, J.P.; BERNATOWSKA-MATUSZKIEWICZ, E.; MIDDLETON-PRICE, H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Animal blood groups and biochemical genetics**, New York, N.Y., v.1, p.87, n.5, p.1663-81, 1996.

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

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

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

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.; ST-PIERRE, C.; BHAUMIK, P.; NIEMINEN, J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunological reviews**, Copenhagen, Jul; 230 (1), p.172-87, 2009.

SAVILL J, DRANSFIELD I, GREGORY C, HASLETT C. A blast from the past: clearance apoptotic cells regulates immune responses. **Nature reviews. Immunology**, London, UK, Dec; 2 (12), p.965-75, 2002.

SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. **Annual review of immunology**, Palo Alto, Calif., v.23, p.197-223, 2005.

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

SMITH JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of leukocyte biology**, New York, Dec; 56 (6), p.672-86, 1994.

SOUTO FO, ALVES-FILHO JC, TURATO WM, AUXILIADORA-MARTINS M, BASILE-FILHO A, CUNHA FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, NY, Jan 15; 183 (2), p.234-42, 2011.

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

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

STOWELL, S.R.; DIAS-BARUFFI, M.; PENTTILA, L.; RENKONEN, O.; NYAME, A.K.; CUMMINGS, R.D. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, Oxford, New York, v.14 (2), p.157-67, 2004.

STOWELL, S.R.; KARMAKAR, S.; ARTHUR, C.M.; JU T.; RODRIGUES, L.C.; RIUL, T.B.; DIAS-BARUFFI, M.; MINER, J.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. **Molecular biology of the cell**, Bethesda, MD, Mar; 20 (5), p.1408-18, 2009.

STOWELL, S.R.; KARMAKAR, S.; STOWELL, C.J.; DIAS-BARUFFI, M.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. **Blood**, New York, v.109 (1), p.219-227, 2007.

STRNAD, J.; BURKE, J.R. IkappaB kinase inhibitors for treating autoimmune and inflammatory disorders: potential and challenges. **Trends in pharmacological sciences**, Amsterdam, Mar; 28 (3), p.142-8, 2007.

SUIRE S, CONDLIFFE AM, FERGUSON GJ, ELLSON CD, GUILLOU H, DAVIDSON K, WELCH H, COADWELL J, TURNER M, CHILVERS ER, HAWKINS PT, STEPHENS L. Gbetagammagamma and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. **Nature cell biology**, London, Nov; 8 (11), p.1303-9, 2006.

TANG, B.M.; MCLEAN, A.S.; DAWES, I.W.; HUANG, S.J.; LIN, R.C. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis.



**American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, Oct 1;176 (7), p.676-84, 2007.

TAVARES-MURTA, B.M.; ZAPAROLI, M.; FERREIRA, R.B.; SILVA-VERGARA, M.L.; OLIVEIRA, C.H.; MURTA, E.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Critical care medicine**, New York, Kolen, May; 30 (5), p. 1056-61, 2002.

TEICHBERG, V.I.; SILMAN, I.; BEITSCH, D.D.; AND RESHEFF, G. A  $\beta$ -D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v.72, p.1383–1387, 1975.

TIMOSHENKO, A.V.; KAYSER, K.; DRINGS, P.; KOLB, G.; HAVEMANN, K.; GABIUS, H.J. Modulation of lectin-triggered superoxide release from neutrophils of tumor patients with or without chemotherapy. **Anticancer research**, Athens, v.13, p.1789–1792, 1993.

TORRES-DUEÑAS, D.; CELES, M.R.; FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SPILLER, F.; DAL-SECCO, D.; DALTO, V.F.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **British journal of pharmacology**, London, Oct; 152 (3), p.341-52, 2007.

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

TOSCANO, M.A.; CAMPAGNA, L.; MOLINERO, L.L.; CERLIANI, J.P.; CROCI, D.O.; ILARREGUI, J.M.; FUERTES, M.B.; NOJEK, I.M.; FEDEDA, J.P.; ZWIRNER, N.W.; COSTAS, M.A.; RABINOVICH, G.A. Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. **Molecular immunology**, Oxford, Elmsford, N. Y., Sep; 48 (15-16), p.1940-9, 2011.

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

VAN DER LEIJ J, VAN DEN BERG A, HARMS G, ESCHBACH H, VOS H, ZWIERS P, VAN WEEGHEL R, GROEN H, POPPEMA S, VISSER L. Strongly

enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. **Molecular immunology**, Oxford, Jan; 44 (4), p.506-13, 2007.

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

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

VYAKARNAM, A.; DAGHER, S.F.; WANG, J.L.; PATTERSON, R.J. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. **Molecular and cellular biology**, Washington, D.C., Aug; 17 (8), p.4730-7,1997.

VYAKARNAM, A.; LENNEMAN, A.J.; LAKKIDES, K.M.; PATTERSON, R.J.; WANG, J.L. A comparative nuclear localization study of galectin-1 with other splicing components. **Experimental cell research**, New York, Aug 1; 242 (2), p.419-28, 1998.

WALZEL, H.; SCHULZ, U.; NEELS, P.; BROCK, J. Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. **Immunology letters**, Amsterdam, Apr 15; 67 (3), p.193-202, 1999.

WANG, L.; FRIESS, H.; ZHU, Z.; FRIGERI, L.; ZIMMERMANN, A.; KORC, M.; BERBERAT, P.O.; BÜCHLER, M.W. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, Baltimore, Aug; 80 (8), p.1233-41, 2000.

WILLIAMS, M.R.; AZCUTIA, V.; NEWTON, G.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F.W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends in Immunology**, Oxford, Oct; 32 (10), p.461-9, 2011.

ZHANG X, MAJLESSI L, DERIAUD E, LECLERC C, LO-MAN R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. **Immunity**. Cambridge, MA, Nov 20; 31(5), p.761-71, 2009.

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