

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

O papel da Galectina-3 na infecção por *Leishmania amazonensis*

Rafael Martins de Oliveira

Monografia apresentada à Coordenação  
do curso de Biotecnologia, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

O papel da Galectina-3 na infecção por *Leishmania amazonensis*

Rafael Martins de Oliveira

Claudio Vieira da Silva

Thaise Lara Teixeira

Monografia apresentada à Coordenação  
do curso de Biotecnologia, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Julho-2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

O papel da Galectina-3 na infecção por *Leishmania amazonensis*

Rafael Martins de Oliveira

Claudio Vieira da Silva  
Instituto de Ciências Biomédicas

Thaise Lara Teixeira  
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do  
curso de Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG

Julho-2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

O papel da Galectina-3 na infecção por *Leishmania amazonensis*

Rafael Martins de Oliveira

Aprovado pela Banca Examinadora em:     /     /     Nota: \_\_\_\_\_

Claudio Vieira da Silva

Uberlândia,     de     de

***Dedicatória***

*Aos meus pais, que durante minha graduação, sempre me apoiaram e fizeram tudo o possível para que eu pudesse chegar até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Dr. Claudio Vieira da Silva, por ter me acolhido no LATRI e ter me dado a oportunidade de iniciar e crescer no meio científico. Sem a sua confiança nada disso seria possível.

Agradeço a minha família: meu pai Paulo Roberto, minha mãe Lucimar e minha irmã Beatriz, pelo apoio e carinho de sempre.

Agradeço a minha namorada Natalia Carine, uma companheira e pesquisadora incrível, que nos últimos dois anos, sempre incentivou meu crescimento e foi minha inspiração para a obtenção do sucesso. Com todo seu amor, carinho e amizade única, você é parte essencial em minha vida.

Agradeço muito aos amigos que fiz no LATRI. Agradeço pela paciência, descontração no dia a dia e principalmente, pelos conhecimentos obtidos com vocês. Muito obrigado Aline, Bruna, Cassiano, Flávia, Júlia, Marlus, Mylla e Samuel. Faço também, um agradecimento especial a minha coorientadora Thaise Lara. Você é a grande responsável por tudo que aprendi nesses anos no laboratório, e sem seus ensinamentos, companheirismo e “alto nível de exigência”, esse trabalho jamais seria possível.

Por fim, gostaria de agradecer também aos amigos que fiz em meu curso: Asaph, Clésio, João Vítor e Pedro. Vocês foram responsáveis pelos momentos mais divertidos e pelas melhores risadas dos últimos quatro anos.

## RESUMO

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, e são transmitidas ao homem pela picada de flebotômíneos fêmeas infectadas. Anualmente são relatados entre 900.000 – 1.3 milhões de novos casos. Existem 3 formas principais da doença – visceral, cutânea e mucocutânea. *Leishmania amazonensis* é uma das espécies responsáveis pelo desenvolvimento da forma cutânea na América do Sul. As principais células hospedeiras envolvidas no processo de infecção de *L. amazonensis* no hospedeiro vertebrado são os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Estas apresentam altos níveis de expressão da proteína Galectina-3, que é caracterizada por ter afinidade por carboidratos que contém beta-galactose. Alguns estudos demonstram que em infecções por microrganismos, Gal-3 desempenha funções como PRR e DAMP, tendo papel importante na inflamação. Neste trabalho, avaliamos o papel da Gal-3 na infecção por *L. amazonensis*. Vimos que, na ausência da proteína, camundongos C57BL/6 infectados apresentam maior invasão e multiplicação do parasito em macrófagos peritoneais e maior carga parasitária nas patas. Nossos resultados sugerem que Gal-3 desempenha papel significativo no controle da infecção por *L. amazonensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose, Galectina-3, Vacúolo parasitóforo

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
1.0 INTRODUÇÃO .....	ii
1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses.....	1
1.2 Características gerais da proteína Galectina-3 .....	6
2.0 OBJETIVOS .....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3.0 METODOLOGIA .....	15
3.1 Aspectos éticos e local de estudo .....	15
3.2 Animais .....	15
3.3 Parasitos <i>in vitro</i> .....	15
3.4 Purificação de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> a partir de patas de camundongos BALB/c. 16	
3.5 Ensaios de cinética de invasão e multiplicação de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO.....	16
3.6 Ensaios <i>in vivo</i> .....	17
3.7 Coleta de órgãos.....	18
3.8 PCR quantitativo em tempo real .....	19
3.9 Análise histológica .....	20
3.10 Análise estatística.....	21
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1 Papel da proteína Gal-3 na infecção de lavado peritoneal de camundongos WT e Gal-3 KO por <i>L. amazonensis in vitro</i> .....	21
4.1.1 Aumento da infecção e da carga parasitária em macrófagos peritoneais <i>knockouts</i> para Gal-3.....	21
4.1.2 Formação de vacúolos parasitóforos em macrófagos peritoneais de camundongos WT e Gal-3 KO infectados por <i>L. amazonensis</i> .....	25
4.1.3 O papel da Gal-3 no recrutamento de leucócitos durante a infecção por <i>L. amazonensis</i> .	27
4.2 Efeito da ausência da proteína Gal-3 na infecção <i>in vivo</i> em camundongos WT e Gal-3 KO infectados por <i>L. amazonensis</i> .....	29
4.2.1 Avaliação da área da pata e do peso dos animais durante 8 semanas de infecção por <i>L. amazonensis</i> .....	29
4.2.2 Perfil inflamatório .....	31
5.0 CONCLUSÃO .....	35
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
ANEXO.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – Brain Heart Infusion

CD4 – Grupamento de diferenciação 4 expressa em leucócitos

CD8 – Grupamento de diferenciação 8 expressa em leucócitos

cDNA – DNA complementar

CR1 – Receptor do complemento 1

CR3 – Receptor do complemento 3

CRD – Domínio de reconhecimento de carboidratos

DAMP – Padrão molecular associado ao dano

DC – Célula dendrítica

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium

Gal-3 – Galectina-3

gp63 – Glicoproteína 63

HE – Hematoxilina e Eosina

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IL-4 – Interleucina 4

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IL-18 – Interleucina 18

KO – *Knockout*

LAMP1 - Proteína associada à membrana lisossomal 1

LPG – Lipofosfoglicano

MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade II

MLCK – Miosina quinase de cadeia leve

NO – Óxido nítrico

PAMP – Padrão molecular associado ao patógeno

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PRR – Receptor de reconhecimento de padrões

qPCR - PCR quantitativo

rpm – Rotações por minuto

siRNA – Pequeno RNA de interferência

Th1 – Linfócito T auxiliar 1

Th2 – Linfócito T auxiliar 2

TNF – Fator de necrose tumoral

VP – Vacúolo parasitóforo

WT – *Wild Type*

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Análise qualitativa de infiltrados celulares nos tecidos das patas de camundongos (WT e Gal-3 KO) infectados com *L. amazonensis*.....**Página 33**

**Tabela 2.** Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos do baço de camundongos (WT e Gal-3KO) infectados com *L. amazonensis*.....**Página 33**

**Tabela 3.** Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos do linfonodo popliteal de camundongos (WT e Gal-3KO) infectados com *L. amazonensis*. .....**Página 34**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo do design experimental *in vivo*.....**Página 18**
- Figura 2.** Aumento da infecção e da carga parasitária em macrófagos peritoneais *knockouts* para Gal-3 no tempo de 4 horas. ....**Página 23**
- Figura 3.** Aumento da infecção e da carga parasitária em macrófagos peritoneais *knockouts* para Gal-3 no tempo de 96 horas. ....**Página 24**
- Figura 4.** Formação de vacúolos parasitóforos em macrófagos peritoneais de camundongos WT e Gal-3 KO infectados por *L. amazonensis*.....**Página 26**
- Figura 5.** Recrutamento de leucócitos durante a invasão e multiplicação por *L. amazonensis*. ....**Página 27**
- Figura 6.** Ensaio *in vivo* usando camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO infectados por *L. amazonensis* durante 8 semanas. ....**Página 30**
- Figura 7.** Efeito da ausência da Gal-3 na carga parasitária das patas e linfonodos de camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO. ....**Página 31**
- Figura 8.** Imagens representativas do tecido das patas em ambos os grupos infectados. ....**Página 34**
- Figura 9.** Imagens representativas de tecido esplênico em ambos os grupos infectados. ....**Página 35**

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais das Leishmanioses

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, e são transmitidas ao homem pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Existem mais de 90 espécies de flebotomíneos que podem transmitir os parasitas. Anualmente são relatados entre 900.000 – 1.3 milhões de novos casos e estima-se que ocorram de 20.000 a 30.000 mortes relacionadas às Leishmanioses. Em 2014, mais de 90% dos novos casos reportados à Organização Mundial da Saúde, ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2016).

Existem 3 formas principais da doença – visceral (a mais grave), cutânea (a mais comum) e mucocutânea. A forma visceral (também conhecida como kala-azar) acomete as vísceras e é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, inchaço do baço e fígado e anemia, que se não tratada, pode levar à morte (WHO, 2016). Em geral, a Leishmaniose cutânea ou mucocutânea se caracteriza pela presença de úlceras sobre a pele, que em alguns casos, pode atingir regiões da mucosa, levando a uma forma mais grave (HANDLER et al., 2015). *Leishmania amazonensis* é uma das espécies responsáveis pelo desenvolvimento da Leishmaniose cutânea na América do Sul. Largamente distribuída no Brasil, *L. amazonensis* pode levar ao desenvolvimento de duas formas da doença: Leishmaniose cutânea localizada e Leishmaniose cutânea difusa (MARLOW et al., 2013). Devido às dificuldades e complexidades do tratamento com as drogas existentes, esta doença continua sendo um importante problema de saúde global, com o número de casos crescendo em alguns países (KEVRIC et al., 2015).

Durante décadas, antimoniais pentavalentes (primeira linha) têm sido utilizados para o tratamento da doença. Na segunda linha estão drogas como a Anfotericina B e Pentamidina. No entanto, os medicamentos são relativamente caros e, portanto, muitas vezes não são acessíveis, principalmente nos países subdesenvolvidos (WHO, 2010). As Leishmanioses têm sido negligenciadas pela indústria farmacêutica e os fármacos que estão disponíveis apresentam sérios efeitos colaterais e exibem aumento de casos relatando resistência do parasito aos fármacos disponíveis (OLIVEIRA et al., 2011; SAVOIA, 2015).

O ciclo de vida de *Leishmania* é heteroxênico, ou seja, envolve um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado. A infecção do inseto vetor ocorre quando a fêmea do flebotomíneo pica um hospedeiro infectado e ingere células sanguíneas vermelhas e outras, como fagócitos mononucleares contendo formas amastigotas. Na porção anterior do trato digestório do inseto, ocorre a transformação dos amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica. Após o rompimento da matriz, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestório, onde se replicam. Em seguida, vão para a região anterior do intestino, onde sofrem a metaciclogênese. Durante esse processo, os promastigotas reduzem o tamanho corporal, aumentam o tamanho e o batimento flagelar e se tornam altamente infectivos, sendo denominados promastigotas metacíclicos. Em seguida, as formas metacíclicas migram para a probóscide e são transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, fechando assim o ciclo de vida (VANNIER-SANTOS et al., 2002; BURCHMORE et al., 2003; MISHRA et al., 2009).

O processo de infecção de *L. amazonensis* no hospedeiro vertebrado envolve neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs), sendo estas células consideradas as principais hospedeiras. Esta relação entre patógeno e células do hospedeiro é o foco de

vários estudos visando o entendimento do processo de estabelecimento das leishmanioses. A adesão do parasita na célula hospedeira ocorre principalmente pelo flagelo ou corpo celular, e o reconhecimento do mesmo envolve moléculas presentes na sua superfície, como lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (gp63), que se ligam a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos (CUNNINGHAM, 2002). Dentre os principais receptores dos macrófagos envolvidos na adesão e no reconhecimento do parasita, estão os receptores do sistema complemento (CR1 e CR3), receptores de manose, receptores de fibronectina e receptores Fcγ (SILVA-ALMEIDA et al., 2010; UENO e WILSON, 2012).

Após a entrada das formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, essas aderem, são fagocitadas e sofrem diferenciação para a forma amastigota (STUART et al., 2008). Após o processo de fagocitose, *Leishmania* sp. é localizada em compartimentos chamados fagossomos. Estes, então, sofrem um processo de maturação que resulta na formação do vacúolo parasitóforo (VP) (ANTOINE et al., 1990; REAL e MORTARA, 2012), nos quais o parasita se diferencia e se multiplica. Estes vacúolos são revestidos por uma membrana originada da membrana plasmática da célula hospedeira, e formado por sucessivos e coordenados eventos de fusão com vesículas da via endocítica. A composição do VP pode diferir dependendo da espécie de *Leishmania* e da célula do hospedeiro envolvido. Para sobreviver, *Leishmania* sp. desenvolveu estratégias visando combater o poder microbicida desse ambiente considerado hostil para a mesma (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Um mecanismo usado por formas promastigotas de *Leishmania* spp. que apresentam vacúolos estreitos e individualizados para contornar as consequências da fagocitose, é a inibição da biogênese do fagolisossomo (DESJARDINS e DESCOTEAUX, 1997). De forma específica, *L. amazonensis* tem a capacidade de

realizar a fusão de vacúolos individuais, formando outros maiores, que diluem proteases presentes nos lisossomos, permitindo que o parasito se transforme na forma amastigota resistente às enzimas (CANTON et al., 2012; REAL e MORTARA, 2012). A maioria das espécies do gênero *Leishmania* reside dentro de vacúolos estreitos e individuais, porém amastigotas de *L. amazonensis* induzem vacúolos maiores que podem conter de 20 a 30 amastigotas (DESJARDINS et al., 1994; ANTOINE et al., 2004; NDJAMEN et al., 2010).

Os amastigotas são capazes de se desenvolver e multiplicar no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo. Nestas condições, a gp63 atua degradando as enzimas lisossomais. Mantendo o controle das condições ambientais internas do vacúolo, o amastigota inicia o processo de multiplicações sucessivas, causando a lise celular, e a liberação de formas amastigotas, as quais poderão ser internalizadas por outros macrófagos ou serem sugados por outro inseto vetor, recomeçando todo o ciclo (MISHRA et al., 2009; NEVES, 2011).

A biogênese do vacúolo contendo *L. amazonensis* envolve a aquisição de marcadores de membrana de endossomos tardios da célula do hospedeiro, como LAMPs, Rab, GTPases, catepsina, ATPases, e moléculas de MHC classe II (REAL e MORTARA, 2012). Durante a formação do VP, amastigotas são primeiramente apresentados em vacúolos menores positivos para LAMP1, nas primeiras 2 horas após a infecção. E ainda, 48 horas pós-infecção, o vacúolo aumenta em tamanho e mantém o fenótipo positivo para LAMP1, com concentrações mais elevadas deste marcador lisossomal nos sítios de contato entre membrana do VP e polo posterior do parasita. Após 96 horas de infecção, o vacúolo se desenvolve completamente com um moderado alargamento (REAL e MORTARA, 2012).



*Leishmania* spp. possui a capacidade de evadir a resposta imune inata do hospedeiro, havendo um crescente aumento de parasitas durante as primeiras semanas de infecção, antes mesmo do desenvolvimento da imunidade adquirida. A imunidade adquirida é dependente de células T CD4+ e CD8+ com perfil de citocina T-helper tipo 1 (Th1). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 12 (IL-12), e fator de necrose tumoral (TNF), leva à ativação de potentes atividades leishmanicidas, como indução da síntese de óxido nítrico (NO), pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e uma explosão oxidativa em células infectadas do hospedeiro e, conseqüentemente, levando a um decréscimo na parasitemia. Por outro lado, a indução de T-helper tipo 2 (Th2), com a produção de citocinas inflamatórias do perfil Th2, como a IL-10, pode levar à susceptibilidade do indivíduo e ao desenvolvimento da doença. Esta resposta imune permite ao parasita persistir em múltiplos tecidos após resolução espontânea ou tratamento de indução da doença clínica (KAYE e SCOTT, 2011).

Na tentativa de melhor entender os mecanismos imunológicos de infecções parasitárias em humanos, têm sido utilizados modelos murinos experimentais com diferentes linhagens de camundongos, uma vez que estes são capazes de mimetizar a infecção humana. Camundongos da linhagem BALB/c são mais suscetíveis à infecção e quando infectados com *Leishmania* sp., apresentam doença progressiva e potencialmente visceralizante (SCOTT e SCHARTON, 1994; FONSECA et al., 2003). Em contraste, camundongos da linhagem C57BL/6 são capazes de controlar a infecção por *Leishmania* sp. (FONSECA et al., 2003). De forma semelhante a resposta imune humana, o perfil de resistência da linhagem C57BL/6 está relacionado a resposta do tipo Th1, que envolve citocinas e ativação das células inflamatórias (XU et al., 1998; WEI et al., 1999), enquanto que o padrão de susceptibilidade é decorrente da resposta

do tipo Th2, relacionada a produção de citocinas anti-inflamatórias e resposta humorais (SYPEK e WYLER, 1991; HEINZEL et al., 1993) e IL-13 (MATTHEWS et al., 2000).

## **1.2 Características gerais da proteína Galectina-3**

As lectinas são proteínas de origem não imunológica, encontradas em diversos seres vivos, como microrganismos, plantas e animais. Possuem a capacidade de se ligar de forma reversível e específica a carboidratos sem qualquer modificação química (LAKHTIN et al., 2011; ZENG et al., 2012). Largamente usadas na natureza, desempenham tarefas importantes, que estão relacionadas a diversos processos associados ao reconhecimento e interação de células, síntese e transporte de proteínas, fotossíntese, regulação da divisão celular, fertilização, imunidade congênita, entre outros (DE SCHUTTER e VAN DAMME 2015; FEIZI e HALTIWANGER, 2015).

No passado, as lectinas foram classificadas de acordo com sua reatividade aos monossacarídeos. Nesse contexto, essa família de proteínas foi dividida em: ligação à manose, ligação à galactose, ligação à quitina e outras lectinas. No entanto, essa classificação não considerava as características estruturais das mesmas. Com o desenvolvimento da ciência, tornou-se possível decifrar a estrutura das cadeias de polipeptídeos presentes nessas moléculas, e dessa forma, outra classificação foi adotada com base na similaridade de sequências de aminoácidos dessas proteínas e a estrutura de seus domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD). Cada CRD é caracterizado por uma única sequência de aminoácidos, uma dobra típica do polipeptídeo e uma estrutura de ligação (VAN DAMME 2014).

Diferentes CRDs podem interagir com estruturas de carboidratos semelhantes, assim, a especificidade das lectinas não é determinada apenas pelo CRD (VAN DAMME et al., 2008). A ligação carboidrato-lectina depende de muitos fatores, como: a

valência da lectina, a estrutura dos locais de ligação e seu arranjo espacial (LAKHTIN, 1994). A especificidade da interação é baseada na presença de certos resíduos de carboidratos em moléculas de glicano. As lectinas podem interagir com monossacarídeos, oligossacarídeos e com resíduos de carboidratos presentes em moléculas como polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos (LEBED et al., 2006; GABIUS et al., 2011). Além disso, elas são específicas de certas estruturas de sacarídeos. Sendo assim, algumas lectinas podem interagir somente com resíduos de manose ou de glicose, por exemplo (KOBAYASHI et al., 2014).

As galectinas estão presentes em vertebrados, invertebrados e fungos (VASTA et al., 1999). Até o momento, 15 tipos diferentes de galectinas foram descritas em mamíferos. De acordo com suas estruturas, elas podem ser classificadas em 3 grupos: galectinas prototípicas (Galectinas 1,2,5,7,10,11,13,14 e 15), que possuem um único tipo de CRD; galectinas em tandem (Galectinas 4,6,8,9 e 12), que apresentam ao menos 2 CRDs distintos, mas homólogos em uma única cadeia polipeptídica; e galectinas do tipo quimera, que são representadas unicamente pela Galectina-3 (Gal-3), com um CRD na região C-terminal e um grande domínio de ligação à proteína na região N-terminal (NIO-KOBAYASHI, 2017). As galectinas prototípicas podem existir na forma de dímeros; as galectinas em tandem possuem dois sítios de ligação a carboidratos; e a Gal-3 pode existir na forma de monômero ou pode se associar através do domínio não-lectínico em complexos multivalentes (LIU e RABINOVICH, 2010).

Algumas dessas proteínas são amplamente distribuídas em diferentes tipos de células e tecidos, enquanto outras são mais seletivamente expressas. Apesar de todas as galectinas se ligarem à galactose, elas têm especificidade para diferentes oligossacarídeos (LIU et al., 2002; RABINOVICH et al., 2007; YANG et al., 2008). Os membros da família da galectina podem ser secretados através de uma via de secreção

ainda não definida e detectados no espaço extracelular. Essas proteínas estão localizadas no citoplasma e podem se mover para o núcleo, ou estar associadas a vesículas intracelulares (LIU et al., 2002).

As galectinas desempenham diversos papéis, incluindo mediação de interações célula-célula e sinalização transmembranar (TAYLOR e DRICKAMER, 2011). Uma grande variedade de tarefas das galectinas tem sido demonstrada em várias células do sistema imune. Essas funções foram reveladas utilizando células transfectadas com cDNA que codificam a galectina, tratadas com pequeno RNA de interferência silenciador (siRNA), ou ainda utilizando células de camundongos *knockouts* (KOs), tendo assim, as situações de superexpressão ou expressão suprimida da galectina (LIU e RABINOVICH, 2010). Estudos demonstram que as galectinas podem funcionar dentro da célula e podem agir de maneira independente à ligação a carboidratos. A Gal-3 em particular, se liga a uma série de proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelulares (LIU et al., 2002).

O *LGALS3* é o gene que codifica a Gal-3 em humanos. Este abrange 17Kb e possui 6 éxons e 5 íntrons, e é formado por 750 pares de bases, que traduzem uma proteína de 250 aminoácidos (RAZ et al., 1991; YUKO et al., 1991; KADROFSKE et al., 1998). Com uma estrutura única entre as galectinas, Gal-3 apresenta sua porção C-terminal (que é o seu CRD), dobrada em forma de sanduíche  $\beta$ , com um núcleo de triptofano e um sítio de ligação de carboidratos não canônico, que medeia interações com açúcares (AGRWAL et al., 1993; MILLER et al., 2016). Na outra extremidade da proteína, está localizada a região N-terminal, de cerca de 120 resíduos contendo um trecho N-terminal com dois potenciais locais de fosforilação (resíduos 6 e 12), seguido por uma região que contém várias repetições em tandem de segmentos de aminoácidos curtos (Prolina-Glicina-Alanina-Tirosina). O domínio rico em glicina e prolina, está

relacionado à capacidade da Gal-3 de se oligomerizar com outras moléculas Gal-3 ou estabelecer interações com proteínas distintas (WANG et al., 2014; IPPEL et al., 2016; MILLER et al., 2016).

Com uma ampla distribuição pelo corpo, Gal-3 pode ser encontrada em diversos tecidos, como trato digestivo e urogenital, pulmões, sangue, rins e coração. Sua expressão é alta em células mieloides como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, bem como em fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (NISHI et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2014; CHEN et al., 2016; YAN et al., 2016; SACCON et al., 2017). A nível celular, a Gal-3 pode estar localizada intracelularmente no citoplasma, núcleo e membranas, além disso, pode ser encontrada fora da célula, seguindo diferentes estímulos depois de sua liberação (FRITSCH et al., 2016; KANG et al., 2016). Várias funções foram atribuídas à Gal-3 dentro da célula, como por exemplo: atividade antiapoptótica, regulação do *splicing* do mRNA, regulação da via de sinalização de FcεRI nos mastócitos e modulação da ativação de RhoA e MLCK durante invasão celular em carcinoma hepatocelular (DAGHER et al., 1995; HAUDEK et al., 2010; SERIZAWA et al., 2015; BAMBOUSKOVA et al., 2016).

Após sua síntese, Gal-3 é armazenada no citoplasma, onde realiza algumas de suas funções, incluindo as que requerem sua entrada no núcleo. Ao sofrer estímulos como uma infecção, por exemplo, a proteína é liberada passivamente das células que estão morrendo ou secretada ativamente por células ativadas. No meio extracelular, a Gal-3 também desempenha uma grande variedade de tarefas que incluem a imunidade inata contra patógenos, e as inflamações aguda e crônica. Estudos recentes demonstraram que a Gal-3 atua como receptor de reconhecimento de padrões (PRR) para o reconhecimento de bactérias, vírus, fungos e parasitas, tendo dessa forma, a capacidade de reconhecer estruturas microbianas (padrões moleculares associados aos

patógenos - PAMPs), que possuem propriedades pró-inflamatórias que promovem a infiltração de neutrófilos e outras células imunes nos sítios infectados; e também pode ser liberada como um padrão molecular associado ao dano (DAMP) (VASTA, 2009, 2012; SATO et al., 2009, 2014; CHEN et al., 2014;).

A expressão de Gal-3 é aumentada em várias células epiteliais e mieloides por estímulos inflamatórios microbianos e não microbianos. Entre os estímulos não microbianos, sabe-se que a Gal-3 é expressa na superfície de monócitos humanos e seu nível de expressão aumenta após a diferenciação para macrófagos. Os monócitos secretam Gal-3 quando estimulados pelo ionóforo de cálcio A23187, sugerindo que estímulos fisiológicos que induzem um aumento do  $Ca^{2+}$  citosólico desencadeiam a liberação de Gal-3 (LIU et al., 1995). Diferentes infecções induzem um aumento na secreção de Gal-3, por exemplo: Gal-3 mostrou-se super expressada em células epiteliais gástricas infectadas por *Helicobacter pylori* (LIM et al., 2003; FOWLER et al., 2006); infecções por *Neisseria meningitidis* levam a um aumento da expressão de Gal-3 em baços de camundongos infectados e em humanos com infecção meningocócica (QUATTRONI et al., 2012); a alta expressão da proteína e aumento na infiltração de neutrófilos foram detectados nas pequenas vias aéreas de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica grave (PILETTE et al., 2007). Estudos demonstram ainda que, Gal-3 pode influenciar o curso da infecção por *Mycobacterium leprae* (CHUNG et al., 2013).

Além de interagir diretamente com os agentes patogênicos, a Gal-3 pode afetar o curso de uma infecção em virtude de seus efeitos nas células do sistema imune inato. Monócitos presentes no sangue e macrófagos dos tecidos desempenham papéis importantes na defesa contra patógenos microbianos e na manutenção da homeostase. Macrófagos e células dendríticas estão presentes na maioria dos órgãos, especialmente

os que estão em contato com o ambiente externo, como a pele, os pulmões e os epitélios das vias digestivas e genitais, desempenhando um papel de sentinelas. Estas células exibem um vasto repertório de receptores inatos para detectar patógenos ou moléculas endógenas liberadas por células danificadas (alarminas) ou secretadas por células ativadas. Após o reconhecimento desses sinais, os macrófagos e células dendríticas se ativam e secretam citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam uma resposta inflamatória (DÍAZ-ALVAREZ e ORTEGA, 2017). Os papéis da Gal-3 nestas células é mediado pela sua ligação a receptores de membrana ou através da Gal-3 intracelular modulando a atividade de proteínas intracelulares (NIEMINEN et al., 2005).

Em um estudo viu-se que a infecção oral por *Toxoplasma gondii* em camundongos induziu alta expressão de Gal-3 em leucócitos infiltrados em órgãos como intestino, pulmão, fígado e cérebro. Comparado aos camundongos WT, os camundongos Gal-3 KO infectados apresentaram resposta inflamatória reduzida no intestino, fígado e cérebro, e maior carga parasitária no cérebro. Em contrapartida, as células dendríticas de camundongos Gal-3 KO produziram mais IL-12, possivelmente na tentativa de compensar a redução no recrutamento de células inflamatórias. Neste estudo, enquanto a atividade pró-inflamatória é provavelmente mediada por Gal-3 extracelular, a Gal-3 intracelular atua modulando a secreção de citocinas nas células dendríticas e, dessa forma, afeta a resposta imune adaptativa (BERNARDES et al., 2006).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue humano e são os primeiros a chegar aos locais de lesão tecidual ou presença de agentes patogênicos. São células efetoras especializadas com a maior capacidade fagocítica e microbicida. A Gal-3 adicionada de forma exógena é capaz de se ligar a neutrófilos *naives* e pré-ativados, induzindo sua ativação, o que reflete na secreção de L-selectina e produção de IL-8. A

ativação de neutrófilos por Gal-3 depende do CRD e do domínio N-terminal (NIEMINEN et al., 2005). Na infecção por *Leishmania major* em camundongos Gal-3 KO, viu-se uma diminuição no número de neutrófilos infiltrados (BHAUMIK et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que a reposição de Gal-3 exógena induziu a migração de neutrófilos para o sítio de infecção (BASERAS et al., 2012), sugerindo que, uma vez liberada das células, a Gal-3 atua como um DAMP, induzindo a migração dos neutrófilos (BHAUMIK et al., 2013). Além de aumentar a migração de neutrófilos para os tecidos inflamados, Gal-3 também participa da remoção dos mesmos, tendo um papel importante para o término de uma resposta inflamatória (KARLSSON et al., 2008).

A evidência do papel da Gal-3 como DAMP também foi vista a partir de estudos de sepses induzidos pela infecção por *Frasciscella* spp. em camundongos. Gal-3 foi relatada como sendo liberada nos pulmões de camundongos com infecção letal por *F. novicida*, e demonstrou que a mesma desempenha um papel importante na indução de infiltração de leucócitos (principalmente neutrófilos), liberação de citocinas inflamatórias, lesão vascular e liberação de mediadores inflamatórios de neutrófilos. Neste modelo, o influxo exacerbado de neutrófilos induzido por Gal-3 foi parcialmente responsável pelo dano ao tecido pulmonar, uma vez que os camundongos Gal-3 KO apresentaram morte celular e danos nos tecidos reduzidos e apresentaram melhores taxas de sobrevivência do que os camundongos WT, apesar de ter uma carga bacteriana semelhante (MISHRA et al., 2013).

Em nosso grupo de estudos, investigamos anteriormente, as atividades biológicas da Gal-3 nas fases aguda e crônica da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* (parasita pertencente à mesma família que *Leishmania* sp.). Camundongos C57/BL6 WT e Gal-3 KO foram infectados por via intraperitoneal e



avaliados quanto à parasitemia, recrutamento de células inflamatórias na cavidade peritoneal e produção de citocinas do baço e coração. Os resultados demonstraram que a ausência de Gal-3 aumentou a parasitemia e reduziu o recrutamento de leucócitos. Em amostras de coração, foi verificado um aumento da secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos animais WT, enquanto que nos animais Gal-3 KO foi detectado um aumento da produção de IL1 $\beta$  e IL-4 durante a fase aguda. Foi observado ainda, que na fase crônica da infecção, o tecido cardíaco de camundongos WT apresentou uma resposta imune com perfil Th2, com níveis basais de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , diminuição na concentração de IL-1 $\beta$  e aumento de IL-4. Esses dados demonstram que a Gal-3 apresentou funções quimiotáticas e imunorreguladoras que são necessárias para controlar a fase aguda da infecção e diminuir o comprometimento cardíaco na fase crônica.

Diversos estudos envolvendo *Leishmania major* (espécie causadora da Leishmaniose cutânea no Velho Mundo), demonstraram que a Gal-3 atua como PRR, reconhecendo moléculas como a Gal $\beta$ 1-3 na superfície do parasita; e como DAMP, facilitando a infiltração de neutrófilos nos sítios de infecção. No entanto, se tratando de *Leishmania amazonensis* (espécie causadora da forma cutânea na América do Sul), não existem muitas informações a respeito. Diante da clara importância da Gal-3 nas infecções patogênicas e da escassez de informações relacionada ao gênero *Leishmania*, somado às evidências de seu papel importante ao longo da infecção por *T. cruzi*, buscamos estudar o papel da proteína Gal-3 no curso da infecção por *L. amazonensis*.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da proteína Galectina-3 no curso da infecção por *Leishmania amazonensis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o processo de invasão e multiplicação do parasito em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e *knockouts* para a proteína Galectina-3 *in vitro*;
- Verificar o número de vacúolos parasitóforos formados em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 Gal-3 KO e WT *in vitro*;
- Caracterizar e quantificar o recrutamento de leucócitos peritoneais em camundongos WT e Gal-3 KO na invasão e multiplicação por *L. amazonensis in vitro*;
- Analisar o crescimento da lesão nas patas de camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO, infectados com *L. amazonensis*, ao longo de 8 semanas *in vivo*;
- Determinar a carga parasitária das patas e linfonodos de animais C57BL/6 WT e Gal-3 KO após 8 semanas de infecção *in vivo*;
- Analisar o escore inflamatório em tecidos de animais WT e Gal-3 KO após 8 semanas de infecção com *L. amazonensis in vivo*.

### **3.0 METODOLOGIA**

#### **3.1 Aspectos éticos e local de estudo**

Este estudo foi realizado respeitando-se todas as normas de biossegurança. A execução dos experimentos envolvendo a utilização de animais segue as normas da Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA), na qual o projeto foi submetido e aprovado (CEUA/UFU 085/12), conforme indica o Anexo 1.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos pertencente ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizado no bloco 2B, sala 200.

#### **3.2 Animais**

Foram utilizados camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 WT e nocautes para Galectina-3 (Gal-3 KO), os quais foram manipulados e eutanasiados de acordo com as normas estabelecidas pela Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos no Biotério da UFU em condição padrão de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com alimento e água *ad libitum*.

#### **3.3 Parasitos *in vitro***

Promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) com passagens controladas, foram cultivados em meio Brain Heart Infusion – HIMEDIA (BHI) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, Brasil), 100mg de gentamicina/mL e 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, Life Technologies, de Nova York, EUA), a  $26^\circ\text{C}$ .

### **3.4 Purificação de amastigotas de *L. amazonensis* a partir de patas de camundongos BALB/c**

Para a manutenção da virulência da cepa,  $10^7$  promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram inoculados com Seringa de Insulina 1 ml (bico slip com Agulha 13 x 3,8 – BD), na região palmar da pata, diluídos em cerca de 40 ul de tampão fosfato salina (PBS). Após 8 semanas, os animais foram devidamente eutanasiados e as patas retiradas para purificação dos amastigotas. As mesmas foram imersas em álcool 70% por 5 minutos e depois lavadas com 1 mL de meio de cultura DMEN. Em seguida as patas foram colocadas em placas Petri estéreis e cuidadosamente tiveram sua pele retirada para a raspagem da lesão com bisturi. Após esse processo, o lavado obtido foi transferido para tubo pistilo para rompimento das células, e depois para um tubo falcon de 15 ml. Posteriormente foram realizadas sucessivas centrifugações diferenciais, sendo que na última, o Pellet foi resuspenso em PBS estéril e passado por 6 vezes em seringa de insulina para dissociar os parasitos. Por fim, os amastigotas obtidos foram contados na câmara de Neubauer e mantidos em garrafas de cultura em meio BHI.

### **3.5 Ensaio de invasão e multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO**

Para a realização dos ensaios de invasão e multiplicação de *L. amazonensis*, 8 animais foram divididos em 4 grupos, sendo eles – camundongos WT ou Gal-3 KO para ensaios de invasão ou multiplicação, sendo 2 animais/grupo.

A infecção dos animais foi realizada utilizando formas promastigotas metacíclicas do parasita. Com o auxílio de uma seringa de insulina, os camundongos foram infectados por via intraperitoneal com 200 ul, contendo  $2 \times 10^7$  parasitos.

Após a inoculação dos parasitos, os animais foram eutanasiados nos tempos de 4 horas para análise da invasão e 96 horas para análise da multiplicação. Os macrófagos peritoneais foram recolhidos utilizando 5 ml de meio DMEM gelado suplementado com 10% de soro fetal bovino, o qual foi inoculado no peritônio e recuperado após 1 minuto. A contagem dos macrófagos foi realizada utilizando câmara de Neubauer.

As células foram divididas em 8 replicatas contendo uma solução de  $10^5$  células/250  $\mu$ l de meio DMEM, foram centrifugadas a 1700 rpm, por 290 segundos em centrífuga citológica Fanem modelo 248 e por último, foram coradas em aparelho corador de lâminas automático SlideInk.

Para avaliação do tamanho dos vacúolos parasitóforos entre WT e Gal-3 KO, o experimento foi repetido utilizando lamínulas de 13 mm, nas quais apenas os macrófagos aderiram. Posteriormente, com o uso de microscopia de luz, foi possível quantificar o número de parasitos/célula infectada em 100 células totais para os ensaios de invasão e o número de parasitos totais em 100 macrófagos infectados.

Para a avaliação dos leucócitos, bem como, do tamanho do vacúolo, foi utilizado microscópio de luz com câmera acoplada para obtenção de 20 imagens por replicata. A avaliação diferencial de leucócitos foi realizada pela análise de 300 células totais/replicata, as quais foram classificadas em: macrófagos, neutrófilos e linfócitos. A quantificação do número de vacúolos foi realizada utilizando software Image J1.48.

### **3.6 Ensaio *in vivo***

Foram utilizados 10 camundongos C57BL/6, com idade de 6 semanas, sendo 5 Gal-3 KO e 5 WT. A infecção dos animais foi feita com o auxílio de uma seringa de Insulina (1ml bico slip com Agulha 13 x 3,8 – BD). Foram inoculados 40  $\mu$ l, contendo  $10^7$  promastigotas de *L. amazonensis* diluídos em PBS 1x estéril, em cada uma das patas

posteriores de cada camundongo. Após o inoculo dos parasitas, os animais foram acompanhados por 8 semanas, sendo pesados e tendo as patas medidas uma vez por semana, através de um paquímetro digital (ZAAS-PAQ-DIGITAL). A partir das medidas de altura e largura obtidas, calculamos a área da pata direita de cada animal, sendo:  $\text{Área} = \text{Largura} \times \text{Altura}$  (Figura 1).

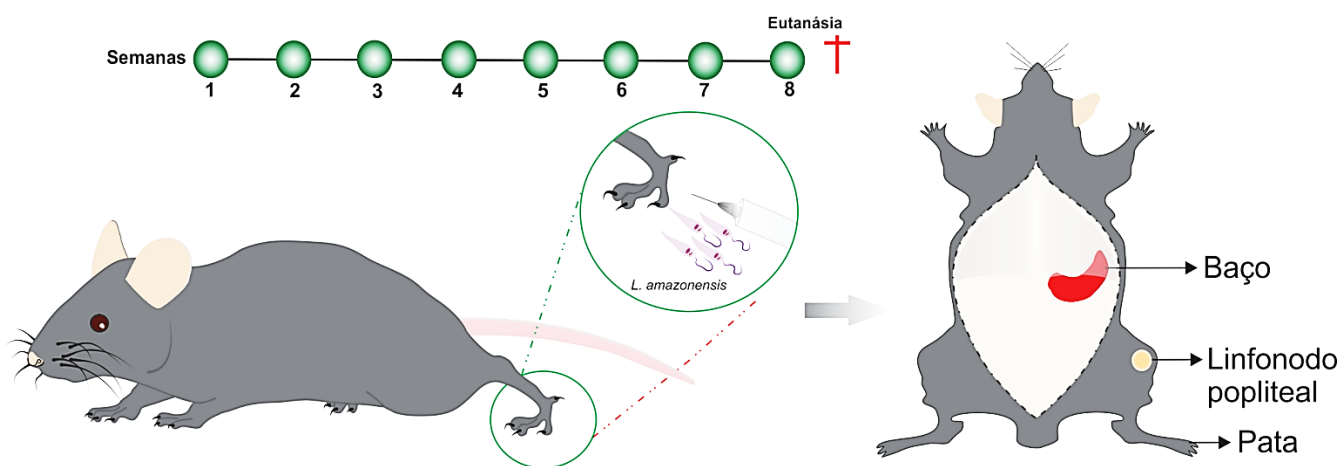


Figura 1. **Esquema representativo do design experimental *in vivo*.** Dez camundongos C57BL/6, com idade de 4 a 6 semanas, sendo 5 Gal-3 KO e 5 WT foram inoculados com 40  $\mu\text{l}$ , contendo  $10^7$  promastigotas de *L. amazonensis* diluídos em PBS 1x estéril, em cada uma das patas posteriores. Após o inoculo dos parasitas, os animais foram acompanhados por 8 semanas, sendo pesados e tendo as patas medidas uma vez por semana, através de um paquímetro digital. Ao final da oitava semana, os animais foram eutanasiados e tiveram retirados: baço, linfonodo poplíteo e pata para posterior análises.

### 3.7 Coleta de órgãos

Oito semanas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e tiveram alguns órgãos coletados para análises. Foram coletadas: as patas direita e esquerda posteriores, baço e linfonodos do poplíteo.

Os linfonodos do poplíteo direito, baço e pata direita de cada um dos animais foram armazenados em solução de formaldeído 4% para posterior confecção de lâminas histológicas. As patas foram fotografadas com câmera de celular, com escala definida, objetivando demonstrar se há a diferença no tamanho do órgão ao longo da infecção entre os grupos WT e Gal-3 KO.

Já os linfonodos do poplíteo esquerdo e a pata esquerda de cada animal foram utilizados para quantificar a carga parasitária por PCR quantitativo em tempo real.

### 3.8 PCR quantitativo

Os tecidos de pata e linfonodo foram separados para utilização em PCR. As partes foram pesadas e o DNA foi extraído utilizando o *PureLink Genomic Dna Kit* (K1820-01, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram digeridas com *PureLink Genomic digestion buffer* e proteinase K a 55°C *overnight*. Após, RNase, *PureLink Genomic lysis/ binding buffer* e etanol PA foram adicionados. O lisado obtido foi colocado em *PureLink spin column*, lavados e eluídos, com tampões específicos. A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-vis).

As reações de qPCR foram preparadas utilizando os oligonucleotídeos: 13A (5'-GGGGTGGAGTCTGGGCGT-3') e 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'), os quais resultam na amplificação de fragmento de DNA do cinetoplasto (120 bp) de *Leishmania sp.* como descrito por Rodgers, Popper e Wirth, 1990.

Para quantificação da carga parasitária, uma curva padrão com diluições seriadas de DNA de 10<sup>6</sup> parasitos/mL de *L. amazonensis*, foi previamente preparada. A eficiência das curvas foi testada, o *slope* ficou entre 110 e 90% e o valor de R<sup>2</sup> sempre maior ou igual a 0,99.

Para reação de qPCR, 50ng de amostras de DNA, quelante de DNA Power SYBR Green PCR Master Mix reagente (Applied Biosystems) e 10µM de cada primer foram utilizados. As reações foram processadas em aparelho termociclador ABI7300 (Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem foram como segue: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 30

segundos (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990). Após a alongação final do qPCR, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 para 95°C, com aumento gradual de 0,5 °C/ segundo para obter a temperatura de *melting* e evitar produtos inespecíficos.

### **3.9 Análise histológica**

Linfonodos poplíteo direito, metade longitudinal dos baços e patas direitas recolhidas dos animais foram processados para análise histológica. Foram fixados em formaldeído 4% (em PBS), posteriormente desidratados em álcoois de crescentes concentrações, diafanizados em xilol e finalmente incluídos em parafina. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura e colocados em lâminas de vidro. Subsequentemente, tais cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise da quantidade de células inflamatórias presentes nos tecidos entre os diferentes grupos. Para analisar a quantidade de células inflamatórias, foi estabelecido o critério dos autores Santos Lima and Minorprio, 1996.

A avaliação da resposta tecidual foi baseada em observações qualitativas e semiquantitativas de fenômenos relacionados à inflamação celular e tecidual encontrados nos órgãos avaliados dos animais selvagens e *knockout* para Galectina-3. O tipo e a gravidade do infiltrado inflamatório foram determinados por dois observadores independentes que foram calibrados quanto à presença ou ausência de (i) resposta inflamatória, (ii) neutrófilos, (iii) macrófagos, (iv) linfócitos, (v) plasmócitos, (vi) células gigante tipo corpo estranho, (vii) tecido necrótico (vii) edema (viii) fibroblastos/fibrose e (ix) adipócitos. Ademais, foi anotada a presença de (x) megacariócitos, (xi) de centros germinativos e (xii) de corpúsculos apoptóticos apenas



nas amostras de baço e/ou linfonodos. Essas características foram pontuadas quanto à intensidade: (-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa.

### **3.10 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três experimentos independentes, em triplicata. A comparação de dados entre os grupos foi analisada pelo teste t ou equivalente não paramétrico e, two way-ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

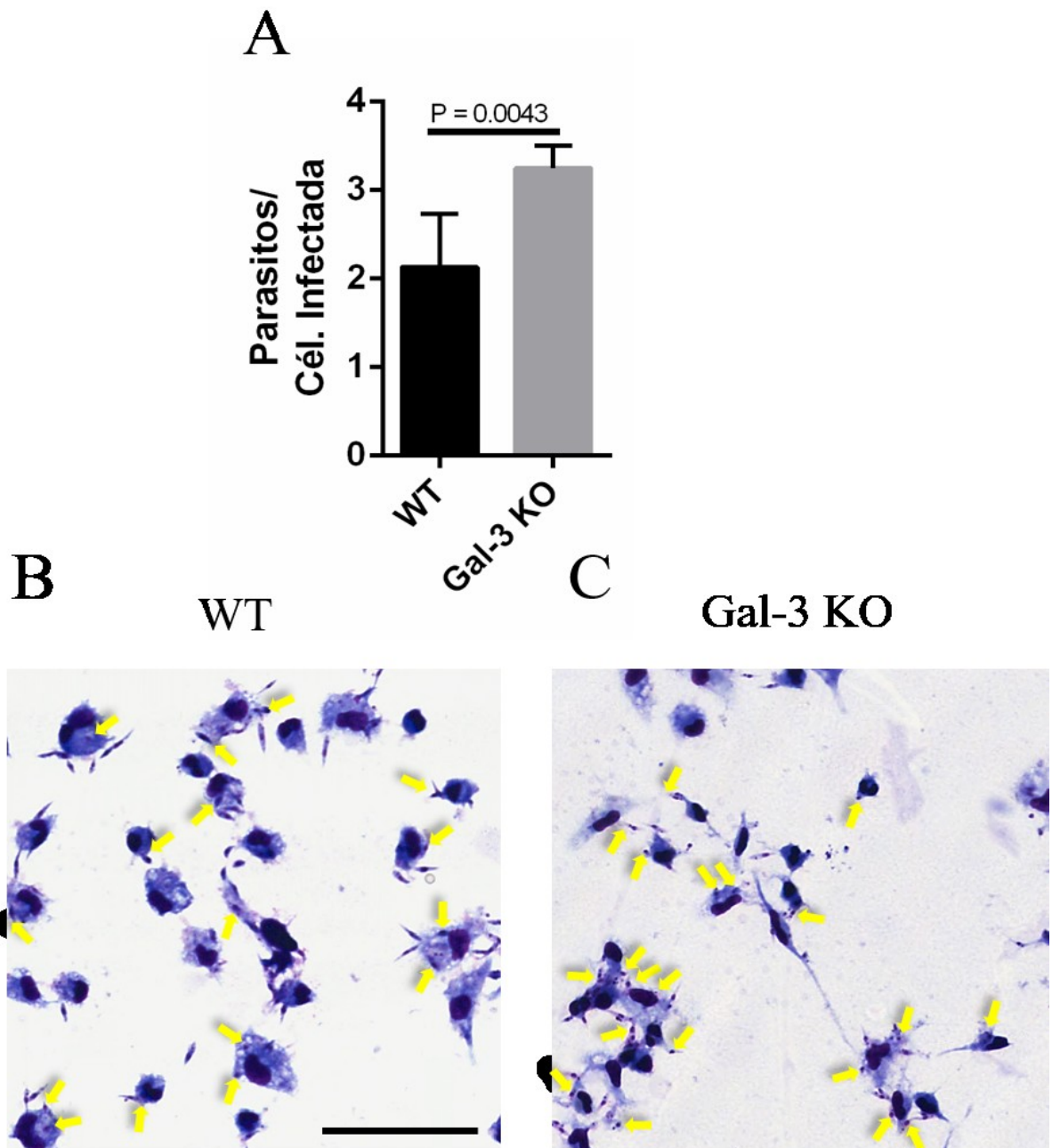
### **4.1 Papel da proteína Gal-3 na infecção de lavado peritoneal de camundongos WT e Gal-3 KO por *L. amazonensis in vitro***

#### **4.1.1 Aumento da infecção e da carga parasitária em macrófagos peritoneais *knockouts* para Gal-3**

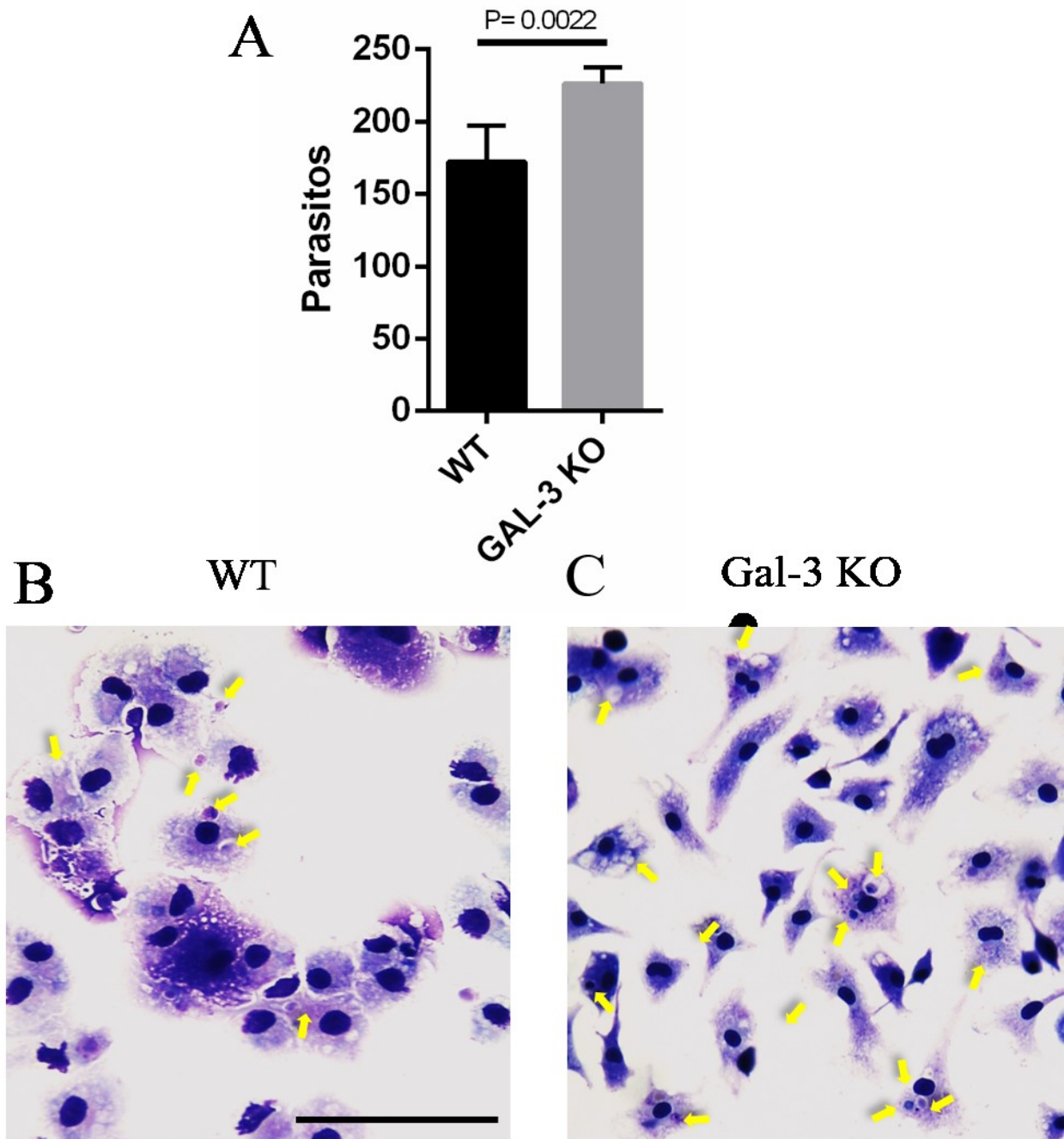
Para demonstrar o papel da proteína Gal-3 na infecção por *L. amazonensis*, foram realizados ensaios de invasão e multiplicação com a forma promastigota e macrófagos peritoneais *in vitro*, visando comparar a diferença entre os grupos WT e Gal-3 KO. Os resultados demonstram que houve maior invasão no grupo Gal-3 KO, com este apresentando um número maior de células infectadas e parasitos, aumentando a relação parasitos/célula infectada em comparação aos selvagens (**Figura 2**). De forma

semelhante, no ensaio de multiplicação, foi observado aumento do número de parasitos no grupo Gal-3 KO em comparação ao grupo WT (**Figura 3**).

Em pesquisa realizada por Da Silva (2017), o papel da Gal-3 na infecção por *T. cruzi* foi estudado. No ensaio de multiplicação utilizando macrófagos peritoneais e formas tripomastigotas do parasito, foi observado aumento no número de parasitos nos macrófagos Gal-3 KO quando comparados aos WT. Estes dados são interessantes e se relacionam aos nossos, uma vez que as espécies *L. amazonensis* e *T. cruzi* pertencem à mesma família (Trypanosomatidae). A maior carga parasitária no grupo Gal-3 KO vista nos ensaios com ambas as espécies, demonstra que na ausência da Gal-3, os macrófagos tendem a ser mais suscetíveis à infecção, fornecendo assim, evidências *in vitro* de que a Gal-3 desempenha um papel importante no controle da proliferação por parasitos intracelulares (DA SILVA et al., 2017).



**Figura 2. Aumento da invasão e do número de parasitos em macrófagos peritoneais *knockouts* para Gal-3 após 4 horas.** Ensaio de invasão com macrófagos peritoneais de C57BL/6 WT e Gal-3 KO infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 4 horas. As células foram fixadas e coradas com Giemsa. **A.** Relação entre o número de parasitos e a porcentagem de células infectadas; **B.** Imagem ilustrativa de macrófagos peritoneais WT após 4 horas de invasão por *L. amazonensis* (Aumento de 40x); **C.** Imagem ilustrativa de macrófagos peritoneais Gal-3 KO após 4 horas de invasão por *L. amazonensis* (Aumento de 40x). As setas indicam parasitos que invadiram as células. A barra de escala representa 50  $\mu$ m.



**Figura 3. Aumento da carga parasitária em macrófagos peritoneais *knockouts* para Gal-3 após 96 horas.** Ensaio de multiplicação com macrófagos peritoneais de C57BL/6 WT e Gal-3 KO infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 96 horas. As células foram fixadas e coradas com Giemsa. **A.** Número total de parasitos em 100 células infectadas; **B.** Imagem ilustrativa de macrófagos peritoneais WT após 96 horas de infecção por *L. amazonensis* (Aumento de 40x); **C.** Imagem ilustrativa de macrófagos peritoneais Gal-3 KO após 96 horas de infecção por *L. amazonensis* (Aumento de 40x). As setas indicam os parasitos que invadiram as células. A barra de escala representa 100  $\mu$ m.

#### 4.1.2 Formação de vacúolos parasitóforos em macrófagos peritoneais de camundongos WT e Gal-3 KO infectados por *L. amazonensis*

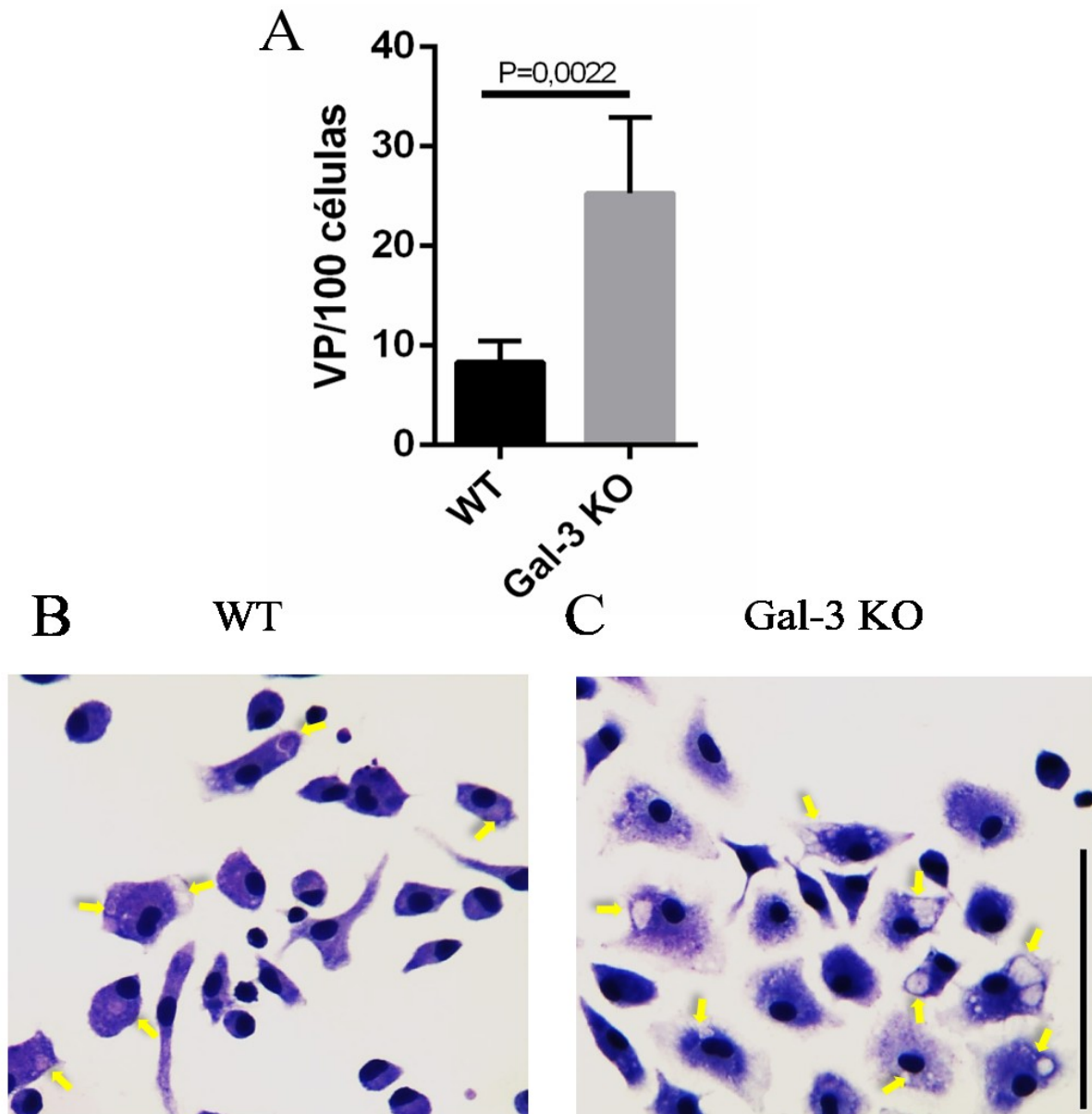
Durante os ensaios anteriores, curiosamente, observamos que o número de vacúolos parasitóforos diferia entre os grupos e, assim, decidimos quantificar. Vimos que no tempo de 96 horas, o grupo Gal-3 KO apresentou um número muito maior de VPs (**Figura 4**).

É sabido que a formação de grandes vacúolos ocorre a partir da fusão de fagossomos com outras vesículas endocíticas durante o tráfego intracelular, e que este fenômeno, induzido pela infecção, favorece a sobrevivência de *L. amazonensis*. A partir disso, o aumento de VPs nos macrófagos *knockouts* para Gal-3 infectados ou não, sugere que na ausência da proteína, a célula é induzida a formar mais vacúolos. E assim, o parasito encontra um ambiente mais favorável para o seu estabelecimento, o que pode explicar o aumento da infecção e replicação de *L. amazonensis* em macrófagos Gal-3 KO.

A relação entre o número de vacúolos e o número de parasitos nas células é outro indicativo de um papel importante da Gal-3 na infecção por *L. amazonensis*.

Em pesquisa feita por Machado (2014), para avaliar o papel da Gal-3 na infecção por *T. cruzi*, observou-se que a proteína desempenha papel importante no tráfego intracelular do parasito. Neste estudo, viu-se que a Gal-3 foi recrutada para o local de entrada dos amastigotas extracelulares em macrófagos e posteriormente se acumulou em torno dos parasitos no instante da lise do fagolisossomo. Levando em consideração que existem algumas semelhanças entre *T. cruzi* e *L. amazonensis*, essa ação desempenhada pela Gal-3 nos estudos com *T. cruzi* pode ser um mecanismo a ser

estudado no futuro para explicar o modo pelo qual a Gal-3 atua na formação e na biogênese dos VPs durante a infecção por *L. amazonensis* (MACHADO et al., 2014).



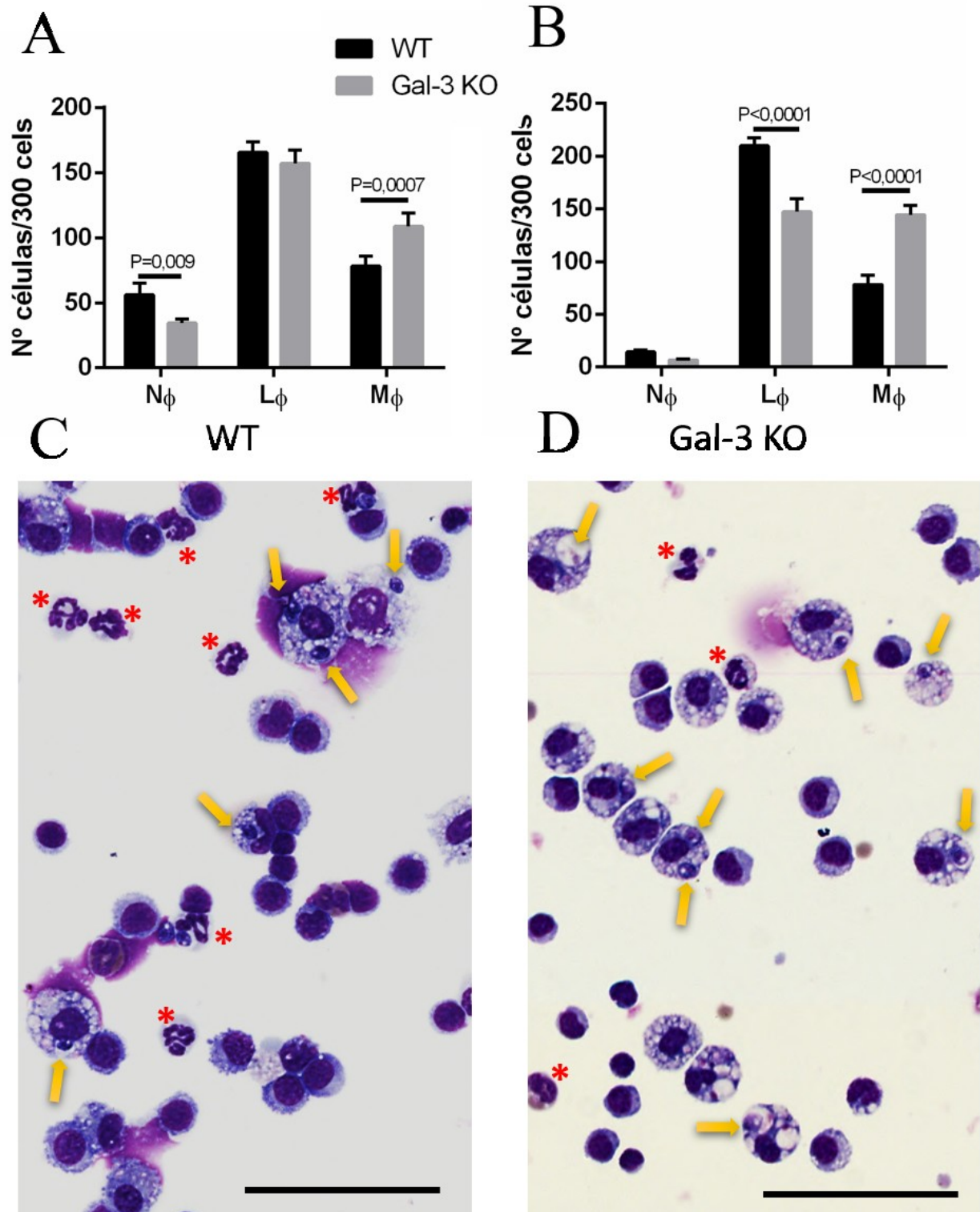
**Figura 4. Formação de vacúolos parasitóforos em macrófagos peritoneais de camundongos WT e Gal-3 KO infectados por *L. amazonensis*.** Ensaio de multiplicação com macrófagos peritoneais de C57BL/6 WT e Gal-3 KO infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, no tempo de 96 horas. As células foram fixadas e coradas com Giemsa. **A.** Número de VPs/ 100 células. **B.** Imagem ilustrativa da formação de VPs em macrófagos peritoneais WT após 96 horas de infecção por *L. amazonensis* (Aumento de 40x). **C.** Imagem ilustrativa da formação de VPs em macrófagos peritoneais Gal-3 KO após 96 horas de infecção por *L. amazonensis* (Aumento de 40x). As setas indicam os VPs. A barra de escala representa 100  $\mu$ m.

#### 4.1.3 O papel da Gal-3 no recrutamento de leucócitos durante a infecção por *L. amazonensis*

Para avaliar o perfil de leucócitos durante o processo de invasão e replicação do parasito, infectamos por via intraperitoneal camundongos WT e Gal-3 KO e, após os tempos de 4 e 96 horas, quantificamos o número de neutrófilos, linfócitos e macrófagos recrutados. No tempo de 4 horas foi observado maior recrutamento de neutrófilos no grupo WT e de macrófagos no grupo Gal-3 KO (**Figura 5A**). Já no tempo de 96 horas, foi observado aumento do recrutamento de macrófagos nos animais Gal-3 KO, e aumento de linfócitos no grupo WT (**Figura 5B**).

Uma vez que os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegar aos sítios de infecção, a presença dos mesmos era esperada entre as células observadas no tempo de invasão por 4 horas. O aumento destes agentes fagocíticos recrutados no grupo WT, sugere ação da proteína Gal-3, atuando como DAMP ou ainda, como receptor de PAMPs, desencadeando uma resposta inflamatória e induzindo a maior migração dos neutrófilos para os sítios de infecção. Este dado corrobora com o estudo realizado por Bhaumik (2013), no qual foi demonstrado que a Gal-3 induz a infiltração de neutrófilos em camundongos infectados por *L. major*. A maior presença dos neutrófilos pode explicar ainda, a menor carga parasitária observada no grupo WT, que seria resultante da ação microbicida destes agentes (BHAUMIK et al., 2013).

O papel da Gal-3 como DAMP, também pode explicar o aumento do número de linfócitos observados no grupo WT, no tempo de 96 horas. De forma semelhante ao que foi visto com os neutrófilos no tempo de 4 horas, a Gal-3 pode induzir a migração dos linfócitos para os sítios de infecção, como consequência da resposta inicial, com o intuito de realizar o combate ao parasito.



**Figura 5. Recrutamento de leucócitos durante a invasão por *L. amazonensis*.** Ensaio de invasão com macrófagos peritoneais de C57BL/6 WT e Gal-3 KO infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, no tempo de 4 horas. As células foram fixadas e coradas com Giemsa. **A.** Número de leucócitos/ 300 células após 4 horas de invasão. **B.** Número de leucócitos/300 células após 96 horas de infecção. **C.** Imagem ilustrativa dos leucócitos WT após 4 horas de invasão por *L. amazonensis* (Aumento de 40x). **D.** Imagem ilustrativa dos leucócitos Gal-3 KO após 4 horas de invasão por *L. amazonensis* (Aumento de 40x). As setas indicam os parasitos que invadiram as células. Os asteriscos indicam os neutrófilos. A barra de escala indica 100  $\mu$ m.



## 4.2 Efeito da ausência da proteína Gal-3 na infecção *in vivo* em camundongos WT e Gal-3 KO infectados por *L. amazonensis*

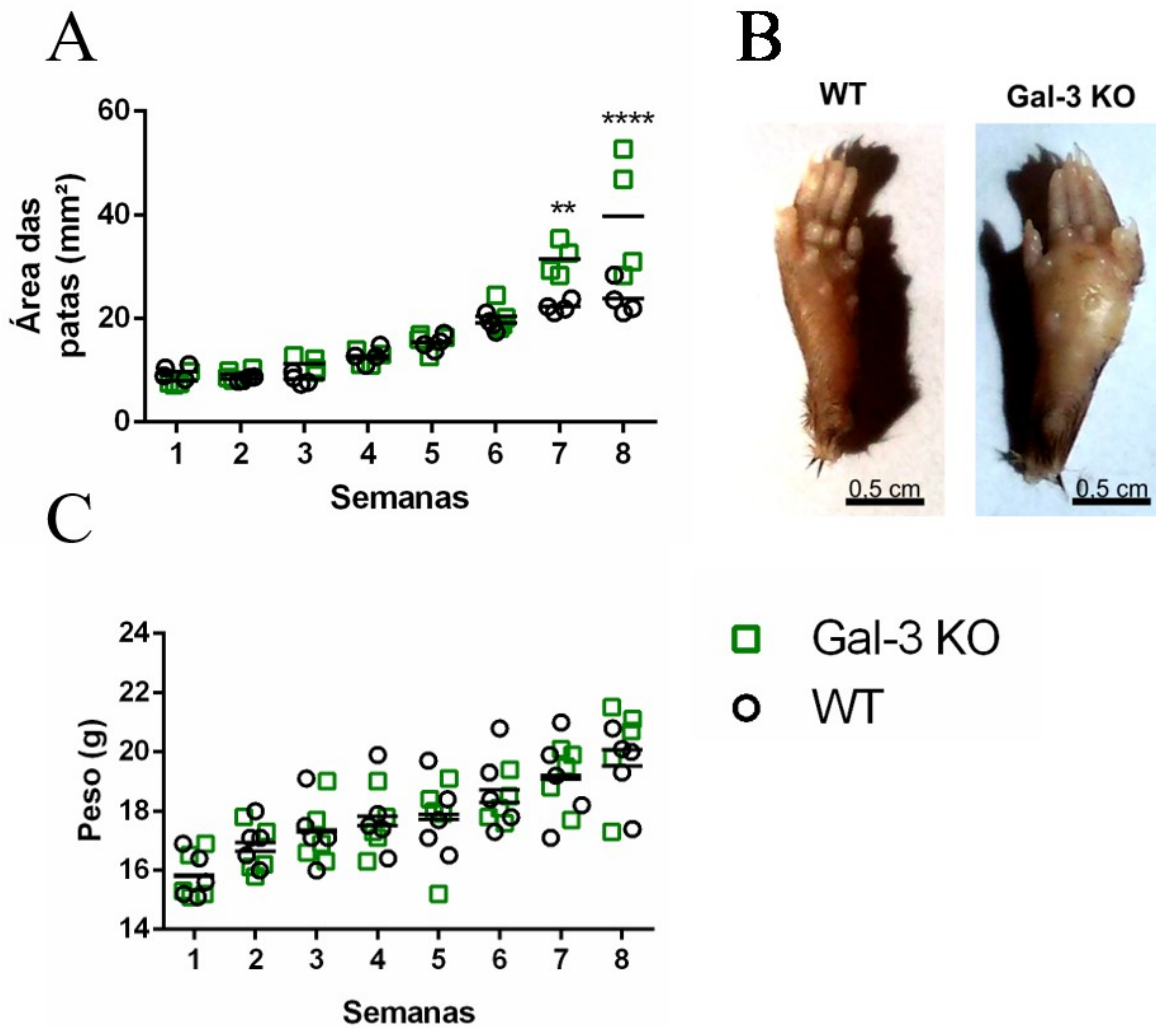
### 4.2.1 Avaliação da área da pata e do peso dos animais durante 8 semanas de infecção por *L. amazonensis*

A partir dos resultados obtidos *in vitro*, decidimos verificar a importância da Gal-3 na infecção *in vivo* de camundongos WT e Gal-3 KO. Esses ensaios foram realizados infectando as patas dos camundongos, com o objetivo de observar as diferenças entre os grupos selvagem e *Knockout* durante a infecção prolongada. Assim, ao longo das oito semanas de duração, as patas foram medidas e os animais pesados semanalmente. No grupo Gal-3 KO, houve aumento da área das patas em relação ao grupo WT a partir da sétima semana de infecção (**Figura 6A**), que pode ser evidenciado na imagem representativa (**Figura 6B**). Por outro lado, o peso dos animais não foi alterado quando comparamos ambos os grupos (**Figura 6C**).

Para verificar se a ausência da Gal-3 poderia influenciar na carga parasitária após 8 semanas de infecção, os linfonodos popliteais e patas foram usados para mensurar e comparar a carga parasitária nos grupos WT e Gal-3 KO. Os resultados mostraram que todos os animais foram positivos para a presença de parasitos. Entretanto, a quantidade de *L. amazonensis* nas patas dos camundongos Gal-3 KO foi superior em relação ao grupo WT (**Figura 7A**). Já nas amostras de linfonodo não houve diferença devido à grande variação de parasitos encontrados entre as replicatas (**Figura 7B**).

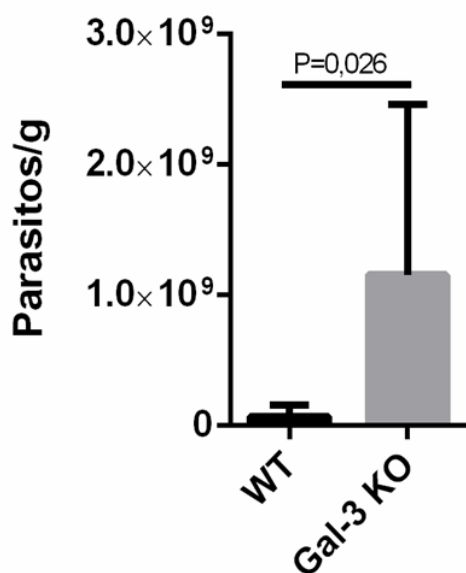
Estes resultados corroboram com o aumento da invasão e multiplicação no grupo Gal-3 KO, observado nos ensaios *in vitro*. Deste modo, os animais *knockout*, mais uma

vez, se mostram mais suscetíveis ao desenvolvimento das lesões nas patas e ao estabelecimento da infecção, indicando que a proteína Gal-3 desempenha um papel fundamental no controle da infecção por *L. amazonensis*.

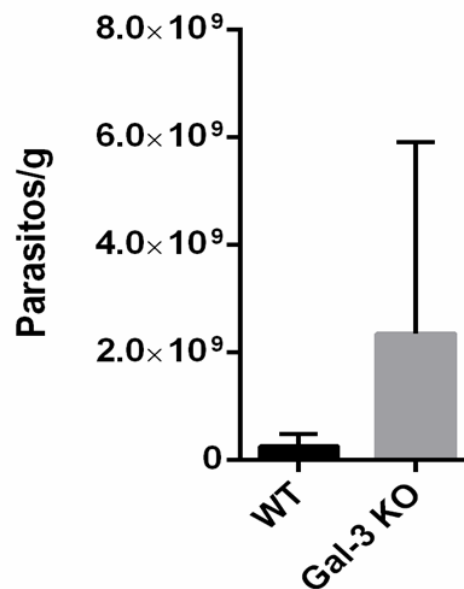


**Figura 6. Medição das patas e do peso de animais infectados com *L. amazonensis* ao longo de 8 semanas.** Camundongos C57BL/6 WT e Gal-3 KO foram infectados na região palmar das patas posteriores, por promastigotas de *L. amazonensis*. Após 8 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados. **A.** Medida da área das patas ao longo das 8 semanas de infecção por *L. amazonensis*. **B.** Imagens ilustrativas das patas de camundongos WT e Gal-3 KO ao final das 8 semanas de infecção. **C.** Peso dos animais ao longo das 8 semanas de infecção por *L. amazonensis*. \*\* P < 0.01, \*\*\*\*P<0.0001.

A



B



**Figura 7. Aumento da carga parasitária das patas de camundongos C57BL/6 Gal-3 KO.** Após 8 semanas de infecção, foi feita a análise da quantidade de parasitos (PCR em tempo real). **A.** Quantidade de parasitos/g de tecido em amostras de patas de camundongos WT e Gal-3 KO após 8 semanas de infecção por *L. amazonensis*. **B.** Quantidade de parasitos /g em amostras de linfonodos do poplíteo de camundongos WT e Gal-3 KO após 8 semanas de infecção por *L. amazonensis*

#### 4.2.2 Perfil inflamatório

Para a análise da resposta inflamatória em ambos os grupos, o baço, o linfonodo do poplíteo e a pata foram coletados e processados para confecção de lâminas histológicas, as quais foram coradas em HE.

Nos cortes das patas, somente no grupo Gal-3 KO foi visto a presença de neutrófilos (**Tabela 1**). De forma contrária ao que vimos no momento da invasão, na infecção prolongada por *L. amazonensis*, a presença de neutrófilos pode indicar ativação da resposta inflamatória de forma tardia. De outra forma, em estudo realizado por Zamora e colaboradores (2017), foi visto que a maior suscetibilidade da infecção

crônica por *L. mexicana* está intimamente associada ao aumento do recrutamento de neutrófilos e de células Th17. Já em modelos de resistência a infecção, existe uma resposta controlada destas células, que ocorrem em menor número.

Além disso, os animais *knockouts*, apresentaram maior quantidade de macrófagos, necrose (**Figura 8**) e edema. E ainda, foi visto que nas patas dos camundongos Gal-3 KO, o infiltrado inflamatório é crônico, sendo basicamente composto apenas por células mononucleares (macrófagos, linfócitos e poucos plasmócitos) (**Tabela 1**). Estes resultados indicam inflamação intensa, característico da persistência da infecção.

No baço notamos mais centros germinativos na região de polpa branca em Gal-3 KO (**Tabela 2**) e, é possível perceber a desorganização estrutural do tecido. (**Figura 9**). Em pesquisa realizada por (SANTANA, et al., 2008), foi avaliado as mudanças inflamatórias e estruturais do tecido esplênico em animais com leishmaniose visceral. Este estudo demonstrou que no tecido esplênico após a infecção por *L. major*, há maior incidência de perisplenite, granulomas, desorganização estrutural e atrofia dos folículos linfóides e da zona marginal. Assim, nossos dados sugerem possível agravamento da infecção, indicando a possibilidade de visceralização da leishmaniose, que deve ser melhor estudada pelo nosso grupo em experimentos futuros.

Nos cortes de linfonodo, vimos uma resposta inflamatória mais intensa em animais Gal-3 KO, com aumento do recrutamento de macrófagos e centros germinativos (**Tabela 3**). Estes dados corroboram com o aumento da área das patas, com o perfil inflamatório, bem como, com o aumento da carga parasitária visto no tecido das mesmas, nos animais *knockouts*. Acreditamos que este aumento da resposta imune esteja ocorrendo na tentativa de elucidar a infecção, porém sem sucesso.

De forma geral, ao analisar o perfil inflamatório nos órgãos coletados, fica evidente o efeito da ausência da Gal-3 na resposta inflamatória dos camundongos *knockout*. Na falta da proteína, de forma parecida ao que vimos nos ensaios *in vitro*, houve um recrutamento maior de leucócitos, principalmente para o local da infecção (patas). Estes resultados sustentam a ideia de que a Gal-3 possui papel importante no controle da infecção por *L. amazonensis*.

**Tabela 1. Análise qualitativa de infiltrados celulares nos tecidos das patas de camundongos (WT e Gal-3 KO) infectados com *L. amazonensis*.**

<b>Crítérios Histológicos</b>	<b>WT</b>	<b>Gal-3 KO</b>
Resposta Inflamatória	Crônica Difusa (++)	Crônica Difusa (+++)
Neutrófilos	-	+
Macrófagos	++	+++
Linfócitos	+	+
Plasmócitos	+	+
Células gigantes de corpo estranho	-	-
Necrose	+	+++
Edema	+	+++
Fibroblastos	++*	++*
Fibrose	-	+
Adipócitos	++*	++*

\* Células residentes não inflamatórias

**Tabela 2. Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos do baço de camundongos (WT e Gal-3KO) infectados com *L. amazonensis*.**

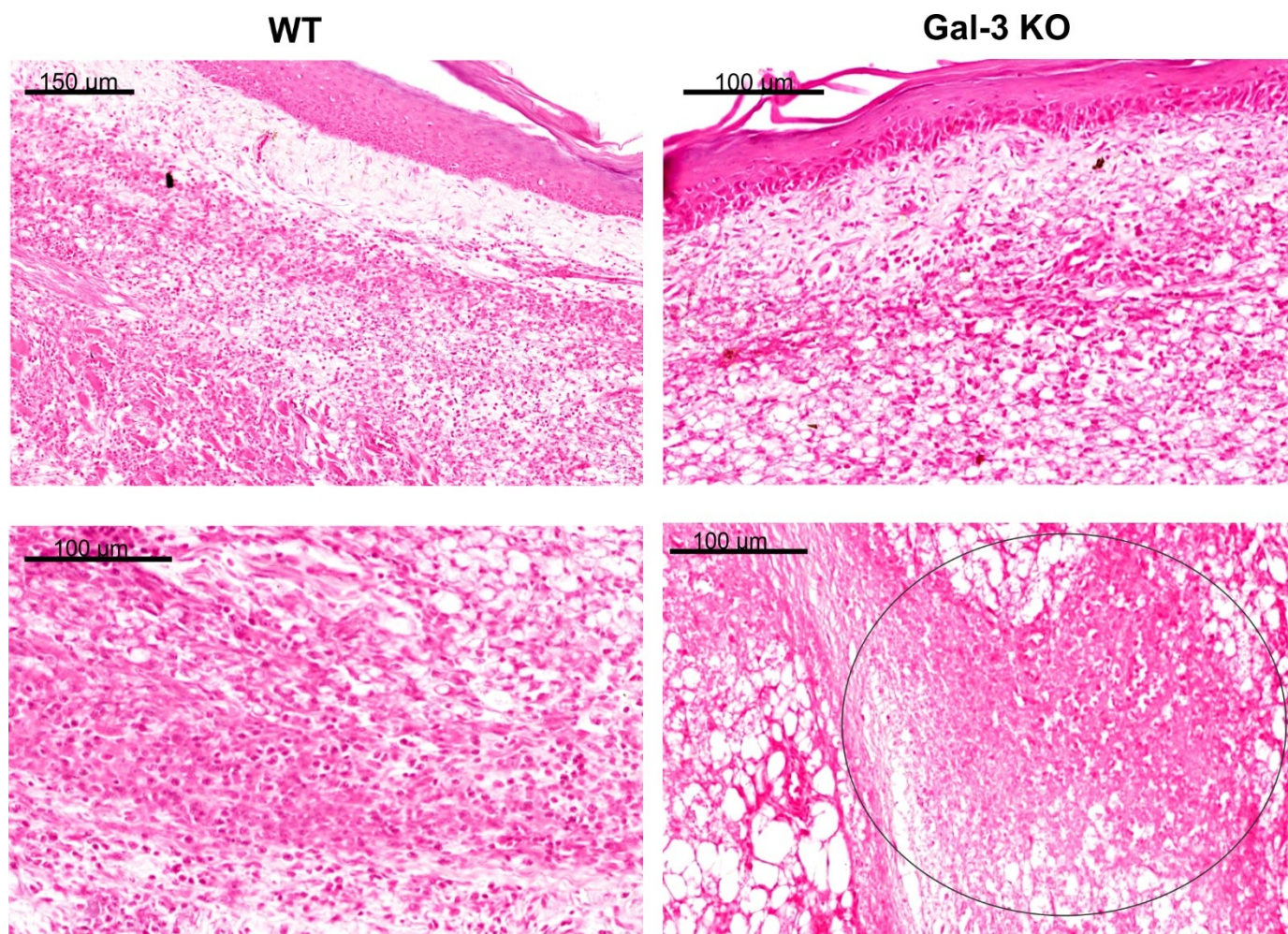
<b>Crítérios Histológicos</b>	<b>WT</b>		<b>Gal-3 KO</b>	
	<b>PB</b>	<b>PV</b>	<b>PB</b>	<b>PV</b>
<b>Regiões</b>				
Neutrófilos	-	-	-	-
Macrófagos	++	++	++	++
Linfócitos	+++	++	+++	++
Plasmócitos	+	-	+	-
Células gigantes de corpo estranho	-	-	-	-
Megacariócitos	-	+	-	+
Centros germinativos	++	-	+++	-
Necrose	-	-	-	-
Edema	+	+	+	+
Fibroblastos	-	+	-	+
Adipócitos	-	-	-	-

PV: Polpa Vermelha; PB: Polpa Branca.

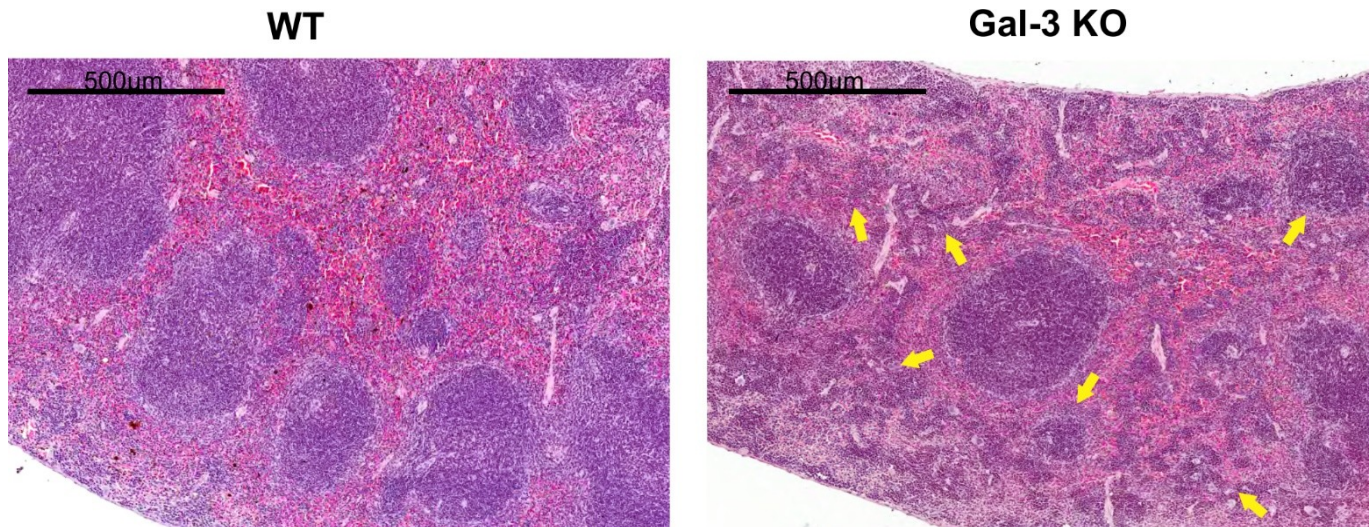
**Tabela 3. Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos do linfonodo popliteal de camundongos (WT e Gal-3KO) infectados com *L. amazonensis*.**

<b>Critérios Histológicos</b>	<b>WT</b>	<b>Gal-3 KO</b>
Resposta Inflamatória	+	++
Neutrófilos	-	-
Macrófagos	++	+++
Linfócitos	+++	+++
Plasmócitos	+	+
Células gigantes de corpo estranho	-	-
Eosinófilos	-	-
Centros germinativos	+	+++
Necrose	-	-
Corpos apoptóticos	+	+
Edema	+	+
Fibroblastos	+*	+*
Fibrose	-	-
Adipócitos	-	-

\* Células residentes não inflamatórias



**Figura 8. Imagens representativas do tecido das patas em ambos os grupos infectados. O destaque indica área de necrose.**



**Figura 9. Imagens representativas de tecido esplênico em ambos os grupos infectados.** As setas amarelas indicam aumento do número de centros germinativos e desorganização estrutural do tecido.

## 5.0 CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram que a Gal-3 desempenha um papel no controle da infecção (invasão de replicação do parasito) e na formação de vacúolos celulares *in vitro*. Bem como, controla a carga parasitária durante a infecção crônica *in vivo*.

Além disso, a Gal-3 tem papel no recrutamento de células do sistema imunológico, como os linfócitos, neutrófilos e macrófagos, evidenciados em ambas as abordagens do presente estudo.

Portanto, mesmo utilizando um modelo animal de resistência para infecção por *L. amazonensis* (C57BL/6), que possui diferentes mecanismos de resposta contra protozoários intracelulares, a deficiência em Gal-3 resultou no aumento da suscetibilidade do animal à infecção. Deste modo, fica evidente o papel da Gal-3 na promoção de uma resposta imune eficaz contra *L. amazonensis*.

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, E.; IDRIS, A.; SAPARON, A. Paper reduction using scs-slm technique in stfbc mimo-ofdm. **ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 12, n. 10, p. 3218–3221, 2017.

AGRWAL, N.; SUN, Q.; WANG, S. Y.; WANG, J. L. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14932–9, 1993. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.

ANTOINE, J. C.; PRIMA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect. Immun.**, v. 58(3), n. 3, p. :779-787, 1990.

ANTOINE, J.-C.; PRINA, E.; COURRET, N.; LANG, T. *Leishmania* spp.: on the Interactions They Establish with Antigen-Presenting Cells of their Mammalian Hosts. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 1–68, 2004.

BAMBOUSKOVA, M.; POLAKOVICOVA, I.; HALOVA, I.; et al., New Regulatory Roles of Galectin-3 in High-Affinity IgE Receptor Signaling. **Molecular and cellular biology**, v. 36, n. 9, p. 1366–82, 2016. American Society for Microbiology.

BASERAS, B.; GAIDA, M. M.; KAHLE, N.; et al., Galectin-3 inhibits the chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils in vitro. **Immunobiology**, v. 217, n. 1, p. 83–90, 2012. Urban & Fischer.

BERNARDES, E. S.; SILVA, N. M.; RUAS, L. P.; et al., *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **The American journal of pathology**, v. 168, n. 6, p. 1910–20, 2006. Elsevier.

BHAUMIK, P.; ST-PIERRE, G.; MILOT, V.; ST-PIERRE, C.; SATO, S. Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 2, p. 630–40, 2013. American Association of Immunologists.

BURCHMORE, R. J. S.; RODRIGUEZ-CONTRERAS, D.; MCBRIDE, K.; et al., Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3901–3906, 2003.

CANTON, J.; NDJAMEN, B.; HATSUZAWA, K.; KIMA, P. E. Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 937–948, 2012.

CHEN, H.-Y.; WENG, I.-C.; HONG, M.-H.; LIU, F.-T. Galectins as bacterial sensors in the host innate response. **Current opinion in microbiology**, v. 17, n. 1, p. 75–81, 2014. Elsevier Limited.



CHEN, J.; HAO, W.; CHANG, K.; LIU, J. Lbos 02-03 The Infiltrating Macrophage-secreted Galectin-3 Plays An Essential Role In Cardiac Fibrosis And Diastolic Function In Murine Pressure-overload Model. **Journal of Hypertension**, v. 34, p. e549, 2016.

CHUNG, A. W.; SIELING, P. A.; SCHENK, M.; et al., Galectin-3 Regulates the Innate Immune Response of Human Monocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 6, p. 947–956, 2013. Oxford University Press.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132–141, 2002.

DAGHER, S. F.; WANG, J. L.; PATTERSON, R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 4, p. 1213–7, 1995.

DA SILVA, A. A.; TEIXEIRA, T. L.; TEIXEIRA, S. C.; et al. Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–9, 2017.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 12, p. 2061–2068, 1997.

DESJARDINS, M.; HUBER, L. A.; PARTON, R. G.; GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 5, p. 677–688, 1994.

DÍAZ-ALVAREZ, L.; ORTEGA, E. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 9–12, 2017.

FEIZI, T.; HALTIWANGER, R. S. Editorial overview: Carbohydrate–protein interactions and glycosylation: Glycan synthesis and recognition: finding the perfect partner in a sugar-coated life. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 34, p. vii–ix, 2015.

FONSECA, S. G.; ROMÃO, P. R. T.; FIGUEIREDO, F.; et al., TNF- $\alpha$  mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 8, p. 2297–2306, 2003.

FOWLER, M.; THOMAS, R. J.; ATHERTON, J.; ROBERTS, I. S.; HIGH, N. J. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 44–54, 2006. Blackwell Science Ltd.

FRITSCH, K.; MERNBERGER, M.; NIST, A.; et al., Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 502, 2016. BioMed Central.

- GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 298–313, 2011.
- HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015. Elsevier Inc.
- HAUDEK, K. C.; SPRONK, K. J.; VOSS, P. G.; et al., Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1800, n. 2, p. 181–9, 2010. Elsevier.
- HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Brief Definitive Report Recombinant Interleukin 12 Cures Mice Infected with *Leishmania major*.
- IPPEL, H.; MILLER, M. C.; VÉRTESY, S.; et al., Intra- and intermolecular interactions of human galectin-3: assessment by full-assignment-based NMR. **Glycobiology**, v. 26, n. 8, p. 888–903, 2016.
- KADROFSKE, M. M.; OPENO, K. P.; WANG, J. L. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 349, n. 1, p. 7–20, 1998. Academic Press Inc.
- KANG, H. G.; KIM, D.-H.; KIM, S.-J.; et al., Galectin-3 supports stemness in ovarian cancer stem cells by activation of the Notch1 intracellular domain. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 68229–68241, 2016. Impact Journals.
- KARLSSON, A.; CHRISTENSON, K.; MATLAK, M.; et al., Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 16–20, 2008. Oxford University Press.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Nature Publishing Group.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015. Elsevier Inc.
- KOBAYASHI, Y.; TATENO, H.; OGAWA, H.; YAMAMOTO, K.; HIRABAYASHI, J. Comprehensive list of lectins: origins, natures, and carbohydrate specificities. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1200, p. 555–77, 2014.
- LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V. Lectins of living organisms. The overview. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 452–455, 2011.
- LEBED, K.; KULIK, A. J.; FORRÓ, L.; LEKKA, M. Lectin-carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance. **Journal of colloid and interface science**, v. 299, n. 1, p. 41–8, 2006.

LIM, J. W.; KIM, H.; KIM, K. H. Cell adhesion-related gene expression by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial AGS cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 8, p. 1284–1296, 2003. Pergamon.

LIU, F. T.; HSU, D. K.; ZUBERI, R. I.; et al., Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 4, p. 1016–28, 1995. American Society for Investigative Pathology.

LIU, F.-T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1572, n. 2–3, p. 263–73, 2002.

LIU, F.-T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, n. 1, p. 158–182, 2010a.

LIU, F.-T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, n. 1, p. 158–182, 2010b. Blackwell Publishing Inc.

MACHADO, F. C.; CRUZ, L.; DA SILVA, A. A.; et al., Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology**, v. 24, n. 2, p. 179–184, 2014.

MARLOW, M. A.; DA SILVA MATTOS, M.; MAKOWIECKY, M. E.; et al. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; et al. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 3, p. 1458–62, 2000.

MILLER, M. C.; IPPEL, H.; SUYLEN, D.; et al., Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain. **Glycobiology**, v. 26, n. 1, p. 88–99, 2016.

MISHRA, B. B.; LI, Q.; STEICHEN, A. L.; et al., Galectin-3 Functions as an Alarmin: Pathogenic Role for Sepsis Development in Murine Respiratory Tularemia. (J. C. Alves-Filho, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59616, 2013. Public Library of Science.

MISHRA, B. B.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V. J.; TIWARI, V. K. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 107–23, 2009.

NDJAMEN, B.; KANG, B. H.; HATSUZAWA, K.; KIMA, P. E. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1480–1494, 2010.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12<sup>o</sup> ed. São Paulo, 2011.

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

NIO-KOBAYASHI, J. Tissue- and cell-specific localization of galectins,  $\beta$ -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. **Anatomical Science International**, v. 92, n. 1, p. 25–36, 2017. Springer Japan.

NISHI, Y.; SANO, H.; KAWASHIMA, T.; et al., Role of Galectin-3 in Human Pulmonary Fibrosis. **Allergology International**, v. 56, n. 1, p. 57–65, 2007. Elsevier.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011. Elsevier B.V.

PILETTE, C.; COLINET, B.; KISS, R.; et al., Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. **The European respiratory journal**, v. 29, n. 5, p. 914–22, 2007. European Respiratory Society.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–29, 2015.

QUATTRONI, P.; LI, Y.; LUCCHESI, D.; et al., Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 1657–1675, 2012.

RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T.; HIRASHIMA, M.; ANDERSON, A. An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 143–158, 2007.

RAZ, A.; CARMI, P.; RAZ, T.; et al., Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein. **Cancer research**, v. 51, n. 8, p. 2173–8, 1991. American Association for Cancer Research.

REAL, F.; MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of leishmania parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

SACCON, F.; GATTO, M.; GHIRARDELLO, A.; et al., Role of galectin-3 in autoimmune and non-autoimmune nephropathies. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 1, p. 34–47, 2017.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. R.; et al., Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008.

SATO, S.; BHAUMIK, P.; ST-PIERRE, G.; PELLETIER, I. Role of Galectin-3 in the Initial Control of *Leishmania* Infection. **Critical Reviews in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 147–175, 2014. Begel House Inc.

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**, v. 230, n. 1, p. 172–187, 2009.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9029–9053, 2015. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

SCOTT, P.; SCHARTON, T. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, p. 84–92, 1994.

SERIZAWA, N.; TIAN, J.; FUKADA, H.; et al., Galectin 3 regulates HCC cell invasion by RhoA and MLCK activation. **Laboratory Investigation**, v. 95, n. 10, p. 1145–1156, 2015.

SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O. P.; ABREU-SILVA, A. L.; D'ESCOFFIER, L. N.; CALABRESE, K. S. *Leishmania amazonensis* infection: Muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 315–318, 2010.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; et al., Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

SYPEK, J. P.; WYLER, D. J. Antileishmanial defense in macrophages triggered by tumor necrosis factor expressed on CD4<sup>+</sup> T lymphocyte plasma membrane. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 4, p. 755–9, 1991.

TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. **Introduction to glycobiology**. 3rd ed. Oxford University Press, 2011.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012.

VAN DAMME, E. J. M. History of Plant Lectin Research. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. v. 1200, p.3–13, 2014.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNON, N.; PEUMANS, W. J. **Plant Lectins**. p.107–209, 2008.

- VANNIER-SANTOS, M. A; MARTINY, A; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.
- VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 424–438, 2009. Nature Publishing Group.
- VASTA, G. R. Galectins as Pattern Recognition Receptors: Structure, Function, and Evolution. . p.21–36, 2012. **Springer**, New York, NY.
- VASTA, G. R.; QUESENBERRY, M.; AHMED, H.; O’LEARY, N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 401–420, 1999. Pergamon.
- WANG, S.-F.; TSAO, C.-H.; LIN, Y.-T.; et al., Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. **Glycobiology**, v. 24, n. 11, p. 1022–35, 2014. Oxford University Press.
- WEI, X. Q.; LEUNG, B. P.; NIEDBALA, W.; et al., Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 5, p. 2821–8, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, , n. 949, p. 22–26, 2010.
- XU, D.; CHAN, W. L.; LEUNG, B. P.; et al., Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 8, p. 1485–92, 1998.
- YAN, X.-J.; YU, G.-F.; JIE, Y.-Q.; et al., Role of galectin-3 in plasma as a predictive biomarker of outcome after acute intracerebral hemorrhage. **Journal of the neurological sciences**, v. 368, p. 121–7, 2016. Elsevier.
- YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 2008.
- YUKO, O.; HAKON, L.; YASUHIKO, S.; KEN-ICHI, K.; BARONDES, S. H. Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen. **Gene**, v. 99, n. 2, p. 279–283, 1991. Elsevier.
- ZENG, X.; ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; SUN, X.-L. Carbohydrate–protein interactions and their biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3161–3176, 2012. Springer-Verlag.



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 111/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 085/12**

Projeto Pesquisa: "Estudos de moléculas envolvidas na invasão e tráfego intracelular das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* in vitro".

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

O adendo ao protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de outubro de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista  
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU