

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Galectina-3 controla a proliferação intracelular de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo)

Mayara Ribeiro

Uberlândia
Setembro, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Galectina-3 controla a proliferação intracelular de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo)

Tese apresentada ao colegiado do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de doutor

Mayara Ribeiro

Dra Eloisa Amália Vieira Ferro

Dra Celene Maria de Oliveira Simões Alves

Uberlândia
Setembro, 2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R484 2020	<p>Ribeiro, Mayara, 1987- Galectina-3 controla a proliferação intracelular de Toxoplasma gondii em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) [recurso eletrônico] / Mayara Ribeiro. - 2020.</p> <p>Orientadora: Eloisa Amélia Vieira Ferro. Coorientadora: Celene Maria de Oliveira Simões Alves. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.703 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Imunologia. I. Ferro, Eloisa Amélia Vieira, 1964-, (Orient.). II. Alves, Celene Maria de Oliveira Simões, 1975-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 135 do PPIPA				
Data:	cinco de outubro de dois mil e vinte	Hora de início:	13h 00min	Hora de encerramento:	17h 17min
Matrícula do Discente:	11623IPA003				
Nome do Discente:	Mayara Ribeiro				
Título do Trabalho:	Galectina-3 controla a proliferação intracelular de <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo)				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de patógenos causadores de doenças infecciosas e parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Identificação e caracterização de moléculas alvo de formas taquizoítas e bradizoítas de toxoplasma gondii e neospora caninum de importância na indução da resposta imune protetora em hospedeiros susceptíveis				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Idessania Nazareth da Costa - UEL/PR; Mariana Bodini Angeloni - UFG/GO; Angelica de Oliveira Gomes - UFTM/MG; Bellisa de Freitas Barbosa - ICBIM/UFU; Eloisa Amália Vieira Ferro - ICBIM/UFU - (Presidente) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro apresentou a Comissão Examinadora e a candidato(a) agradeceu a presença do público, e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Eloisa Amália Vieira Ferro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/10/2020, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/10/2020, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Bodini Angeloni, Usuário Externo**, em 05/10/2020, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 05/10/2020, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Idessania Nazareth Costa, Usuário Externo**, em 05/10/2020, às 18:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2303039** e o código CRC **81E75612**.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Cida e Nilo, e ao meu irmão, Fernando. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a seguir o caminho que queria. Muito obrigada por tudo. Amo vocês.

Agradecimentos

❖ Agradeço à professora Eloisa que me aceitou em seu laboratório ainda quando eu estava no segundo período da graduação. Desde então, são anos de convivência. Desde que te conheci te admirei, primeiro como professora, depois, que te conheci um pouco melhor, como pessoa. Você sempre cuidou de todas nós como se fossemos mesmo suas filhas. Aprendi ao longo desse tempo muita coisa com você e para onde vou te levo como exemplo. Muito obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela confiança que sempre depositou em mim.

❖ Agradeço à professora Celene que coorientou esse trabalho. Obrigada por me permitir executar esse trabalho, que foi ideia sua. Obrigada pelo apoio, por analisar os dados comigo, pela correção sempre criteriosa. Obrigada pela parceria.

❖ Agradeço às “minhas gatinhas do lab”, Andressinha, Angel, Bê, Fer, Idê, Iliana, Mari, Pâmela, Pri, Rafa. No laboratório, nosso ambiente de trabalho por tanto tempo, ficamos amigas. Dividimos nossas experiências profissionais e pessoais, nossas angústias, tristezas, alegrias. Sempre uma apoiando a outra. Sou muito grata pela amizade vocês. Sem vocês tudo seria mais difícil.

❖ Agradeço a minha amiga de infância, minha irmã, Laianne, que mesmo longe sempre me apoiou e torceu por mim.

❖ Agradeço aos meus colegas de trabalho no laboratório em especial Samuel, Guilherme e Alessandra que contribuíram e me ajudaram muito para a conclusão desse trabalho.

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
1. Introdução	7
1.1. Toxoplasmose.....	7
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1.3. Resposta imune a <i>T. gondii</i>	11
1.4. Galectina 3.....	13
1.5. Células trofoblásticas e resposta imune na gestação	16
1.6. Galectina 3 e gestação	18
2. Justificativa.....	20
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. Material e Métodos	22
4.1. Manutenção de células BeWo em cultura	22
4.2. Manutenção de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
4.3. Inibição da expressão de Gal-3 nas células BeWo.....	23
4.4. Western Blotting para Gal-3.....	23
4.5. Imunofluorescência para Gal-3	24
4.6. Ensaio de invasão proliferação intracelular de <i>T. gondii</i>	25
4.7. Ensaio de adesão de <i>T. gondii</i> nas células BeWo.....	25
4.8. Detecção de citocinas	26
4.9. Mensuração da produção de ROS	27
4.10. Análise estatística.....	27
5. Resultados.....	28
5.1. Silenciamento da expressão da Gal-3 em células BeWo.....	28
5.2. Gal-3 diminui a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo.....	28
5.3. Gal-3 atua na invasão e adesão de <i>T. gondii</i> nas células BeWo.....	28
5.4. Gal-3 interfere no perfil de citocinas produzidas por células BeWo.....	29
5.5. Gal-3 não altera a produção de ROS em células BeWo.....	29
6. Discussão.....	30
7. Conclusão.....	35
8. Referências Bibliográficas.....	36
Legendas	49
Figuras.....	51

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose. A infecção pelo parasito pode apresentar-se assintomática, contudo, manifestações clínicas podem ocorrer, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e em fetos devido à transmissão congênita. Em gestantes, a infecção pode causar abortos, prematuridade e/ou anomalias fetais. Na interface materno-fetal vários tipos de células e moléculas contribuem para o desenvolvimento fetal, regulação do sistema imune e defesa contra microorganismos. Galectina-3 (Gal-3) é uma lectina ligante de resíduos β -galactosídeos-expressa em células do microambiente placentário, incluindo células trofoblásticas. Esta lectina está envolvida em vários processos biológicos, dentre eles, regulação do crescimento, diferenciação e migração celular, apoptose, modulação da atividade de células do sistema imune, reconhecimento de patógenos e controle de infecções por parasitos intracelulares, como *T. gondii*. Contudo, ainda pouco é compreendido sobre o papel da Gal-3 na infecção por *T. gondii* no microambiente placentário. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo geral investigar o efeito da Gal-3 na infecção de células trofoblásticas da linhagem BeWo por *T. gondii*. Para isso, neste estudo, foram utilizadas células BeWo cuja expressão de Gal-3 foi silenciada por meio da utilização de RNA de interferência (RNAi) (BeWo Gal-3 KD; KD: *knockdown*) e células não – silenciadas (BeWo Gal-3); posteriormente, foram determinados (i) as taxas de proliferação intracelular, adesão e invasão do parasito; (ii) produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD. Os resultados obtidos mostraram que Gal-3: (i) controla a proliferação intracelular de *T. gondii*; (ii) diminui a adesão de *T. gondii*; (iii) diminui a invasão de *T. gondii*; (iv) aumenta a produção da citocina IL-6 independentemente da infecção por *T. gondii*; (v) não interfere sobre a produção de ROS em células BeWo. Assim, Gal-3 parece ter um papel pró-inflamatório em células BeWo o que pode explicar o menor parasitismo observado nas células que expressam Gal-3. Esse foi o primeiro trabalho a mostrar a influência de Gal-3 no controle de *T. gondii* em células trofoblásticas.

Palavras chave: Galectina 3; *Toxoplasma gondii*; IL-6; células trofoblásticas

Abstract

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite that causes toxoplasmosis. Infection by the parasite may be asymptomatic, however, clinical manifestations may occur, especially in immunocompromised individuals and in fetuses due to congenital transmission. In pregnant women, the infection can cause miscarriages, prematurity and / or fetal abnormalities. At the maternal-fetal interface, several types of cells and molecules contribute to fetal development, regulation of the immune system and defense against microorganisms. Galectin-3 (Gal-3) is a β -galactoside residue-binding lectin expressed in cells of placental microenvironment, including trophoblastic cells. This lectin is involved in several biological processes, including growth regulation, cell differentiation and migration, apoptosis, modulation of immune cell activity, pathogen recognition and infection control by intracellular parasites, such as *T. gondii*. However, little is known about the role of Gal-3 in the placental microenvironment during *T. gondii* infection. Thus, this work aimed to investigate the effect of Gal-3 on *T. gondii* infection in BeWo trophoblastic cells. For this, Gal-3 expression was silenced in BeWo cells by interference RNA (RNAi) (BeWo Gal-3 KD; KD: knockdown) or not (non-silenced cells (BeWo Gal-3)); subsequently, (i) intracellular proliferation, adhesion and invasion of the parasite; (ii) production of cytokines and reactive oxygen species (ROS) were determined in BeWo Gal-3 and BeWo Gal-3 KD cells. The results obtained showed that Gal-3: (i) controls the intracellular proliferation of *T. gondii*; (ii) decreases the adhesion of *T. gondii*; (iii) decreases the invasion of *T. gondii*; (iv) increases the production of the cytokine IL-6 regardless *T. gondii* infection; (v) does not interfere on ROS production in BeWo cells. Thus, Gal-3 appears to have a pro-inflammatory role in BeWo cells, which may be related to the lower parasitism observed in cells that express Gal-3. This was the first study to show the influence of Gal-3 on *T. gondii* control in trophoblastic cells.

Keywords: Galectin-3; *Toxoplasma gondii*; IL-6; trophoblastic cells

1. Introdução

1.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença parasitária que acomete seres humanos e outros animais. Ela é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. A doença acomete cerca de um terço da população mundial (SASAI & YAMAMOTO, 2019). O parasito apresenta ciclo de vida heteroxeno, cujo hospedeiro definitivo são os felinos e os hospedeiros intermediários mamíferos e aves (SASAI & YAMAMOTO, 2019). Ao longo de seu ciclo de vida, *T. gondii* possui três estágios evolutivos taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (KOTA & SHABBIR, 2020).

Os taquizoítas são encontrados na fase aguda da infecção e se multiplicam rapidamente (KOTA & SHABBIR, 2020). Nesse estágio, o parasito é capaz de infectar vários tecidos, como cérebro, retina e placenta e pode desencadear manifestações clínicas nos hospedeiros (ANDER et al., 2018; KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018; PORTILLO et al., 2019; KOTA & SHABBIR, 2020). Com o início da resposta imune do hospedeiro, o parasito consegue estabelecer uma infecção crônica pela conversão dos taquizoítas em bradizoítas, que é a fase de lenta multiplicação do parasito (WATTS et al., 2015; BLADER et al., 2015; KATO, 2018). Os bradizoítas ficam no interior de cistos teciduais em locais que são bem oxigenados como cérebro e musculatura (KOTA & SHABBIR, 2020). Os oocistos representam a fase de resistência do parasito no ambiente, e são liberados no ambiente pelas fezes dos felinos (KOTA & SHABBIR, 2020).

A infecção por *T. gondii* pode ocorrer pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos, ingestão de água ou alimento contaminados com oocistos, transfusões de sangue ou órgãos, acidentes laboratoriais e passagem placentária de taquizoítas (DUBEY et al. 2012). Os felinos se infectam pela ingestão de taquizoítas, oocistos no ambiente ou cistos contendo os bradizoítas (ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012; DUBEY et al. 2012). As formas infectantes penetram no intestino delgado do felino e lá se multiplicam por esquizogonia, processo em que ocorre divisão nuclear sem haver separação citoplasmática, formando esquizontes. Posteriormente, os núcleos migram para porção basal do esquizonte e vão sendo individualizados pela membrana plasmática, formando os merozoítas que iniciam a formação dos gametas. Os microgametas (gametas masculinos) saem das células onde estão e se locomovem até as células onde estão os macrogametas (gametas femininos), fecundando-os. Forma-se o zigoto que passa a ser

envolto por uma parede dupla, dando origem aos oocistos que são liberados pelas fezes (KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018; DELGADO et al., 2019).

Os hospedeiros intermediários ingerem os oocistos contendo os esporozoítas, que penetram no intestino, caem na corrente sanguínea e invadem vários tipos celulares, onde irão se multiplicar intensamente formando os taquizoítas e, assim, podem atingir vários órgãos. Em decorrência da pressão do sistema imune do hospedeiro, o parasito pode se converter em bradizoítas envoltos por cistos, forma de resistência do parasito no hospedeiro (WATTS et al., 2015; SUZUKI et al., 2020). Colocar as formas de infecção

A infecção em adultos imunocompetentes saudáveis é assintomática em cerca de 50% dos casos, embora também possa causar uma doença leve inespecífica que apresenta sinais e sintomas como febre, mal-estar, erupção maculopapular, cefaleia, fadiga e linfadenopatia sensível (KOTA & SHABBIR, 2020). Em indivíduos imunocomprometidos e, causa uma infecção grave que pode desencadear graves sequelas, como, retinocoroidite, encefalite, doenças mentais (BLADER et al., 2015; KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018; KOTA & SHABBIR, 2020). A toxoplasmose congênita, como resultado da transmissão vertical de mães infectadas, é causa significativa de morbidade e mortalidade em fetos, neonatos e crianças à medida que avançam para a idade adulta. Como a infecção assintomática é mais comum, o diagnóstico pode ser feito prontamente por meio de testes sorológicos (KHAN & KHAN, 2018; KOTA & SHABBIR, 2020).

O tratamento da toxoplasmose é indicado para os indivíduos imunocomprometidos e gestantes. O tratamento padrão é a associação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (DUNAY et al. 2018). Nas gestantes esse tratamento é utilizado caso tenha a confirmação da infecção fetal, porém ele não é utilizado antes do terceiro mês de gestação pelo efeito teratogênico que a pirimetamina apresenta. Assim, caso o feto não tenha sido acometido pela infecção e antes do terceiro mês de gestação, a gestante é tratada com espiramicina (DUNAY et al. 2018). Apesar desses tratamentos serem utilizados, o uso deles, principalmente durante a gestação podem gerar efeitos colaterais indesejáveis e comprometer o desenvolvimento do feto. Assim, várias pesquisas buscam alternativas para o tratamento da toxoplasmose. A azitromicina é um desses tratamentos alternativos que já foi estudada em células de linhagem humana e explantes placentários humanos mostrando eficácia contra a infecção (FRANCO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017; FRANCO et al. 2019).

Além de ser importante encontrar uma nova terapia medicamentosa com menor efeito colateral, estudos que visam esclarecer os mecanismos envolvidos na infecção são muito importantes, pois podem levar à descoberta de possíveis alvos para intervenção farmacológica, principalmente durante a gestação. Nesse contexto, compreender o papel de moléculas envolvidas na infecção, principalmente no microambiente materno-fetal torna-se muito importante. Uma molécula que já foi estudada em modelos murinos e demonstrou ter importância na infecção pelo parasito é a Galectina-3 (Gal-3) (ALVES et al. 2010; ALVES et al., 2013), porém ainda não existem estudos suficientes sobre o papel no curso da infecção.

1.2. *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa (KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018). O parasito possui forma alongada com as extremidades arqueadas. A região anterior do parasito é caracterizada pela presença do complexo apical composto por elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide, uma estrutura em forma de cone oco, formada por três anéis de microtúbulos, e organelas secretórias, como micronemas e roptrias (BLADER et al., 2015; KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018; PACHECO et al. 2020). Essas organelas, juntamente com os grânulos densos, são importantes nos processos de adesão e invasão das células hospedeiras, bem como manutenção do parasito no interior das mesmas (SUAREZ et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Micronemas são pequenas estruturas em forma de bastão, encontradas na extremidade anterior do protozoário, delimitadas por membrana e com conteúdo eletrondenso, composto por grande número de proteínas produzidas no retículo endoplasmático e glicosiladas no complexo de Golgi (SOUZA et al., 2010). As proteínas secretadas a partir das micronemas (MICs) são importantes nos eventos de reconhecimento, adesão e invasão das células hospedeiras pelo protozoário (MEISSNER et al. 2002; BLADER et al., 2015; KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018). Durante o contato do pólo apical do parasito com a superfície da célula hospedeira, as micronemas liberam MICs que facilitam a adesão do protozoário à célula hospedeira por meio do reconhecimento de receptores na superfície dessas células e, portanto, são essenciais nos estágios iniciais da invasão (MEISSNER et al. 2002; SOUZA et al., 2010; HARKER et al., 2015). Algumas proteínas secretadas a partir das micronemas contêm diferentes

domínios de adesão, semelhantes a proteínas adesivas em células eucariotas, por exemplo, domínios do tipo integrinas (MIC2), tipo trombospondina (MIC 1 e 2), tipo EGF (fator de crescimento epidermal) (MIC 6, 7, 8 e 9) e tipo lectinas (MIC3 e MIC 8), os quais medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira (DOWSE et al. 2004; SOUZA et al., 2010). Cabe ressaltar que a proteína MIC-2 é expressa em todos os estágios invasivos do parasito e consegue ligar-se às moléculas de adesão do hospedeiro, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), permitindo ao parasito migrar até os tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta (BARRAGAN, HITZIGER, 2008; HARKER et al., 2015; MUNOZ, LIESENFELD, HEIMESA, 2011).

Roptrias são organelas maiores que as micronemas localizadas na região apical dos taquizoítos de *T. gondii*. As roptrias apresentam uma região basal mais larga e outra afilada voltada para a região apical do parasito, conhecida como pescoço da organela. As proteínas armazenadas nas roptrias distribuem-se nas porções basal (ROPs; *Rhoptry body proteins*) e apical (RONs; *rhoptry neck proteins*) (SOUZA et al., 2010; ZHU et al., 2019). O processo de invasão da célula hospedeira requer secreção coordenada e sequencial de proteínas das micronemas e roptrias (ZHU et al., 2019). Além disto, as roptrias estão associadas à síntese do vacúolo parasitóforo (TAHARA et al., 2016; KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018). Os grânulos densos são organelas esféricas distribuídas ao longo do corpo do parasito e contêm grande concentração de proteínas (proteínas dos grânulos densos: GRAs) (SOUZA et al., 2010). Estas organelas descarregam seu conteúdo proteico, principalmente dentro do vacúolo parasitóforo, permitindo a manutenção do parasito no mesmo, já que as glicoproteínas desses grânulos impedem a fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo (MERCIER & CESBRON-DELAUW, 2015; SOUZA et al., 2010; NAM et al., 2009).

Como *T. gondii* não necessita de um receptor específico da célula hospedeira para invadir a célula, o parasito é capaz de infectar uma vasta gama de células em diferentes hospedeiros, incluindo o homem (KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018). Dentre as formas de infecção estão a ingestão de alimento ou água contaminados com oocistos, liberados na natureza por meio das fezes de felinos; ingestão de carne mal cozida contendo cistos; transfusões de sangue ou órgãos infectados, acidentes laboratoriais e a transmissão vertical (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ELMORE et al., 2010).

T. gondii apresenta três linhagens clonais que foram isoladas na Europa e América do Norte classificadas como tipos I, II e III (HOWE & SIBLEY, 1995). As três linhagens

são muito semelhantes geneticamente, mas diferem quanto à virulência. Cepas do tipo I, como RH, são mais virulentas e letais em camundongos do que as do tipo II (ME49) e III (VEG). Essas são consideradas de virulência moderada e podem estabelecer uma infecção crônica, pois as formas taquizoítas se multiplicam lentamente, se comparadas com as cepas do tipo I, e a formação de cistos teciduais é mais rápida (SAEIJ et al., 2005).

Estudos demonstram que existem diferenças nas manifestações clínicas da infecção por *T. gondii* e, provavelmente estejam associadas ao tipo de cepa (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; HILL; SU, 2012; HASSAN et al. 2019). Em humanos, os três tipos de cepas clonais são capazes de causar toxoplasmose, no entanto, as cepas do tipo I geralmente estão associadas a manifestações clínicas graves da doença, como toxoplasmose ocular. Já as cepas tipo II são mais comumente isoladas de infecções crônicas e congênitas e em pacientes imunocomprometidos, como portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (XIAO; YOLKEN, 2015). As cepas do tipo III são mais comuns em animais e não estão associadas à manifestação de sintomas, sendo que os poucos casos encontrados em humanos estão relacionados com imunodeficiência do hospedeiro (SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Além dessas três linhagens clonais, vários estudos mostram que há uma grande variedade de cepas que não pertencem a nenhuma dessas linhagens clonais (SIBLEY et al, 2009; KHAN et al., 2011; SU et al., 2012). Essas cepas atípicas são denominadas recombinantes ou exóticas e são encontradas principalmente na África e América do Sul (BOUGHATTAS et al. 2011; RAJENDRAN; DUBEY, 2012; FRANCO et al., 2014; GALAL et al., 2019). No Brasil, há uma grande diversidade, dentre elas, estão duas cepas que foram isoladas na cidade de Uberlândia-MG que foram denominadas Udi1-CH05 e Udi2-CH05 que são cepas que apresentam uma maior virulência se comparadas com as cepas de linhagem clonal (SALOMÃO et al. 2007; FRANCO et al., 2014; FRANCO et al., 2015).

1.3. Resposta imune a *T. gondii*

A invasão de *T. gondii* nas células do hospedeiro desencadeia respostas do sistema imune inato e adaptativo (SASAI et al. 2018; FISCH et al. 2019). Receptores do tipo Toll (TLRs) em células hospedeiras são importantes durante a resposta imune inata porque são capazes de reconhecer ligantes expressos pelo parasito (YAROVINSKY, 2014). A interação de *T. gondii* com esses receptores, induz a produção de Interleucina-12 (IL-12)

pelas células da imunidade inata do hospedeiro, como células natural killer (NK), células dendríticas e macrófagos (YAROVINSKY, 2014; ISMAIL et al. 2017; IVANOVA et al., 2019). Dentre as funções de IL-12 está a indução da produção de Interferon gamma (IFN- γ) (MA et al. 2015; IVANOVA et al., 2019).

A citocina IFN- γ é o maior mediador de resistência à infecção por *T. gondii* e promove vários mecanismos intracelulares para inibir a replicação e eliminar o parasito (DUPONT et al., 2012; YAROVINSKY, 2014). Essa citocina favorece a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, previne a ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reagudização da infecção no hospedeiro (MILLER et al., 2009). Além disso, IFN- γ ativa macrófagos que são células fagocíticas importantes tanto na imunidade inata quanto adaptativa, uma vez que além de secretarem citocinas pró-inflamatórias, fagocitam e destroem patógenos (SILVA; LANGONI, 2009; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Outra citocina que exerce papel importante na proteção inicial contra a infecção é TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa). Vários tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, células T e células dendríticas produzem esta citocina, a qual aumenta a capacidade microbicida de macrófagos e induz as células NK a produzirem IFN- γ (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; KÖNER et al., 2010). IFN- γ e TNF- α , induzem a expressão da molécula de adesão ICAM-1 (JULIANO et al., 2006). Essa molécula é importante em respostas imunes inata e adaptativa porque está envolvida na migração transendotelial de leucócitos para os sítios de inflamação, assim como em interações entre as células apresentadoras de antígeno (APC) e os linfócitos T (LAWSON; WOLF, 2009).

Após a resposta inicial da imunidade inata, os linfócitos tornam-se ativados e passam a produzir outras citocinas. A imunidade adquirida é representada pela atividade de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, portanto, a imunidade mediada por células é predominante durante a infecção por *T. gondii*, quando macrófagos, linfócitos T, células “natural killers” (NK) e leucócitos polimorfonucleares são funcionalmente ativos em hospedeiros imunocompetentes (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; SILVA; LANGONI, 2009). A IL-12 leva à diferenciação de células T CD4 *naives* em células TCD4⁺ auxiliares do tipo 1 (Th1), que irão produzir citocinas inflamatórias (YU et al. 2015). IL-12 também estimula a produção IFN- γ por linfócitos TCD8⁺. Além disso, essas células produzem enzimas proteolíticas capazes de romper a membrana de parasitos livres ou provocar o rompimento das células infectadas, exercendo, assim, importante papel na proteção do hospedeiro contra o parasito (HWANG, KHAN, 2015).

A produção de IFN- γ e TNF- α a partir de células Th1 e TCD8⁺ intensifica a função dos macrófagos e promove o controle do patógeno (GIGLEY et al., 2011; MUNOZ et al., 2011). Assim, a infecção por *T. gondii* provoca uma resposta imunológica do tipo Th1, com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias que protegem o hospedeiro contra o parasito. Entretanto, *T. gondii* é capaz de induzir várias mudanças na transcrição de genes do hospedeiro, incluindo os que estão envolvidos no metabolismo energético, resposta imune e sinalização, conseguindo, dessa forma, evadir da resposta imune desencadeada pelo hospedeiro e estabelecer seu nicho como parasito intracelular (HUNTER; SIBLEY, 2012; LIMA et al., 2019).

1.4. Galectina 3

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas naturais, derivadas de plantas ou animais, ligantes de açúcares (MISHRA, et al., 2019). De modo geral, as associações entre lectinas e glicanos são essenciais na regulação de interações entre células, entre células e componentes da matriz extracelular, bem como entre células e patógenos (THAN et al., 2015).

Galectinas são um subgrupo de lectinas que contêm um ou dois domínios de reconhecimento de carboidratos (*carbohydrate-recognition domains*; CRDs) com afinidade por glicanos que contêm beta-galactosídeo (β -galactosídeo) (CHOU et al. 2018). Atualmente, existem 15 tipos de galectinas descritas com diversas funções biológicas importantes, tais como regulação dos eventos de crescimento, proliferação e diferenciação celular, apoptose, transdução de sinal, bem como interações célula-célula e célula-matriz extracelular (CHOU et al. 2018). Além disso, galectinas participam de respostas imunes, como em processos inflamatórios agudos e crônicos, na regulação da tolerância imune e, também, em respostas associadas a interações hospedeiro – patógenos (BLOIS et al., 2007; RABINOVICH et al., 2009; SATO et al., 2009; LIU et al., 2010). Estudos também sugerem a participação das galectinas na regulação da angiogênese e de tumores (GRIFFIOEN et al., 2014; BLOIS et al., 2015). Na interface materno-fetal, tem sido descrita a expressão marcante de algumas galectinas (THAN et al., 2015), cuja expressão desregulada tem sido associada a complicações gestacionais (THAN et al., 2015). As galectinas são classificadas em três grupos de acordo com sua estrutura: galectinas prototípicas, que apresentam apenas um CRD (galectina 1, galectina 2, galectina 5, galectina 7, galectina 10, galectina 11, galectina 13, galectina 14, galectina

15); as galectinas tipo “tandem”, com dois CRDs (galectina 4, galectina 6, galectina 8, galectina 9 e galectina 12); e do tipo quimérica com um CRD e uma extensão N-terminal que aumentam a avidéz de ligação ao ligante beta-galactosídeo (galectina 3) (BRINCHMANN et al. 2018; CHOU et al. 2018).

A galectina 3 (Gal-3) foi primeiramente descrita na superfície de macrófagos em 1982 por Ho e Springer. Desde então, vários estudos vêm demonstrando que esta proteína está presente em vários tipos celulares, como células do sistema imune (monócitos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos), fibroblastos e células endoteliais (LIU, 2005; PAPASPYRIDONOS et al., 2008; LU et al., 2016; BAMBOUSKOVA et al., 2016). Além disso, Gal-3 é encontrada em alguns tecidos, incluindo epitélio respiratório, gastrointestinal, rins e placenta humana (NITA-LAZAR et al., 2015; PARK et al., 2016; CHEN, KUO, 2016; HUTTER et al., 2016; XIAO et al., 2019). Predominantemente, Gal-3 está localizada no citoplasma e no núcleo das células, mas pode ser encontrada também na superfície celular e na matriz extracelular, dependendo de alguns fatores, dentre eles o tipo celular e fase de proliferação em que a célula se encontra (SCIACCHITANO et al., 2018).

Por ser encontrada em vários locais na célula, Gal-3 desempenha algumas funções importantes. Gal-3 relaciona-se com a diferenciação celular, como a diferenciação de osteoblastos, osteoclastos, linfócitos B, linfócitos T, oligodendrócitos (IACOBINI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; GILSON et al., 2019; THOMAS et al., 2020). Além disso, Gal-3 está envolvida na migração e ativação de alguns tipos celulares, como mastócitos e macrófagos (DRAGOMIR et al., 2012; BAMBOUSKOVA et al., 2016; CASSAGLIA et al., 2020). Estudos demonstram que Gal-3 também tem papel importante em algumas doenças, podendo inclusive ter potencial terapêutico em algumas delas. Em alguns tumores, como no endométrio, nos ovários, na mama e nos pulmões, Gal-3 está envolvida com aumento de metástase, já que as células tumorais apresentam maior capacidade de invasão e migração (PEREIRA et al. 2019; JIANG et al., 2019; LUK et al. 2020; HISRICH et al. 2020). Ademais, a expressão de Gal-3 também é maior em doenças, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, exercendo papel inflamatório importante também no curso dessas doenças (SHI et al., 2015; HU et al., 2016). No microambiente placentário, as galectinas 1, 3 e 9 são amplamente expressas durante a embriogênese em humanos e camundongos (THAN et al., 2015).

Para desempenhar suas funções dentro da célula, Gal-3 ativa várias vias de sinalização intracelulares. Por exemplo, no núcleo da célula, a ativação de importantes

vias, como das MAP quinases, demonstra o papel de Gal-3 na regulação do ciclo celular, na proliferação celular, no processamento de RNAm dentre outras funções. Além disso, no citoplasma, dependendo do estímulo, Gal-3 pode induzir ou inibir a apoptose celular (YANG et al., 2011; DUMIC, DABELIC, FLOGEL, 2006). Ao se ligar no receptor CD-95, Gal-3 ativa caspases que estão relacionadas com a apoptose. Por outro lado, Gal-3 está relacionada com a ativação de MAP quinases, especialmente ERK, promovendo inibição da via apoptótica (DUMIC, DABELIC, FLOGEL, 2006). Assim, Gal-3 tem um importante papel na regulação de eventos que acontecem intracelularmente.

Durante processos infecciosos, galectinas citosólicas podem ser passivamente liberadas ou secretadas ativamente por células inflamatórias. As galectinas podem, então, ligar, por meio dos CRDs, a uma ampla variedade de patógenos, os quais exibem ligantes em sua superfície, por exemplo, bactérias Gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae*), Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*), vírus envelopados (*human immunodeficiency virus* [HIV]-1, influenza vírus A), fungos (*Candida albicans*) e parasitos (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, e *Trichomonas vaginalis*) (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010; SATO et al., 2012; SATO et al., 2014; THAN et al., 2015; CHENG et al., 2017; VERMA et al., 2019).

No aparelho reprodutor feminino, a galectina mais estudada é Gal-3. Células epiteliais não-ciliadas das tubas uterinas expressam Gal-3 na sua membrana apical. Neste sentido, estudo sugere que a galectina pode ligar-se a lipooligossacarídeos em *Neisseria gonorrhoeae* e facilitar a invasão das células epiteliais Gal-3 positivas (JOHN et al., 2002). Além disto, a produção aumentada de TNF- α em resposta a essa infecção induz apoptose em células não expressando Gal-3 (Gal-3 negativas). Assim, uma vez que a infecção é principalmente limitada às células positivas para Gal-3, a galectina favorece a sobrevivência do patógeno (JOHN et al., 2002). Na infecção por *Trichomonas vaginalis*, Gal-3, e Gal-1, são capazes de ligarem-se a lipofosfoglicano na superfície do parasito (RYAN et al., 2011). Essas galectinas liberadas por células do epitélio vaginal modulam respostas inflamatórias por ativação de células imunes residentes (FICHOROVA et al., 2009). Além disto, Gal-3 estimula a migração de células fagocíticas, como neutrófilos, para o sítio de infecção (SATO et al., 2002; FOWLER et al., 2006). Esses eventos contribuem para a eliminação do patógeno (SATO et al., 2002; FOWLER et al., 2006; FICHOROVA et al., 2009).

Recente estudo com macrófagos de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* mostrou que células que expressam Gal-3 conseguem sobreviver mais tempo, permitindo que os parasitos se proliferassem e conseguissem infectar novas células (CHAIN et al., 2020). Além disto, foi demonstrado que em células HeLa expressando Gal-3, a porcentagem de células infectadas foi maior quando comparadas com células que não tinham Gal-3, evidenciando que Gal-3 parece favorecer a infecção por esse parasito (CHAIN et al., 2020). Contudo, estudo anterior sugeriu que Gal-3 está relacionada com a sobrevivência, proliferação e migração de células mesenquimais e, portanto, teria potencial terapêutico em cardiomiopatias relacionadas à doença de Chagas (SOUZA et al., 2017).

Na infecção por *Toxoplasma gondii*, Gal-3 aumenta a viabilidade e ativação de neutrófilos infectados *in vitro* com o parasito (ALVES et al. 2010). Além disso, Gal-3 é importante para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos peritoneais de camundongos infectados pela cepa RH de *T. gondii* (ALVES et al., 2013). Ainda, na infecção oral de camundongos por *T. gondii*, foi observado que houve indução da expressão da Gal-3 em leucócitos infiltrantes no intestino, pulmões, fígado e cérebro. Em animais geneticamente modificados, com expressão diminuída da Gal-3 e infectados observou-se uma resposta inflamatória reduzida no intestino, fígado e cérebro e maior carga parasitária no cérebro nos animais, quando comparados aos animais Gal-3 positivos e infectados. Além disto, células dendríticas dos animais com expressão diminuída da Gal-3 exibiram maior produção de IL-12 e os animais mostraram acentuada resposta imune com perfil Th1. Assim, Gal-3 exerce papel na imunidade inata, por gerar uma resposta pró inflamatória, e também por apresentar um papel regulador em células dendríticas, capaz de interferir na imunidade adaptativa (BERNARDES et al., 2006).

Diante do exposto acima, Gal-3 participa, por meio de mecanismos distintos, das respostas imunes na defesa contra vários microrganismos patogênicos. Contudo, ainda não dispomos de informações acerca das contribuições dessa glectina na interface materno-fetal em condições de infecção pelo parasito *T. gondii*.

1.5. Células trofoblásticas e resposta imune na gestação

O trofoblasto é uma barreira celular de origem fetal que se interpõem entre a circulação materna e fetal, constituindo uma ferramenta essencial no sucesso da gestação (POLLHEIMER, KNÖFLER, 2012). Essas células são responsáveis por romper a

barreira epitelial uterina, promovendo a implantação do blastocisto no endométrio. Além disto, o trofoblasto ainda permite nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

Células trofoblásticas expressam receptores que são capazes de reconhecer a presença de bactérias, vírus, parasitos, células em apoptose e tecidos danificados. Após este reconhecimento, o trofoblasto secreta citocinas específicas, como IL-10, TGF- β , TNF, IL-12 e IL-6, as quais vão atuar sobre as células presentes na decídua, influenciando a resposta frente ao patógeno (SHARMA, GODBOLE, MODI, 2016; CHAU et al., 2016; KOGA; ALDO; MOR, 2009).

Um balanço entre citocinas de perfil Th1 e Th2 é necessário para o sucesso da gestação (MAUBON et al., 2008; CHALLIS et al., 2009). Os processos de invasão do trofoblasto e implantação requerem um microambiente inflamatório. A implantação do blastocisto no endométrio está associada a um aumento na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (WU et al. 2012). Além disso, citocinas de perfil Th1 mantêm a decídua e contribuem na modificação das artérias espiraladas, permitindo maior fluxo sanguíneo para o embrião (SHARMA, GODBOLE, MODI, 2016).

Apesar desse perfil pró inflamatório ser necessário para a implantação, durante a gestação ocorre uma polarização para a resposta imunológica do tipo Th2, a qual é responsável pela produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β 1 (Fator de crescimento tumoral β 1), as quais favorecem o desenvolvimento do feto semi-alogênico. Citocinas anti-inflamatórias são liberadas por células maternas como células NK uterinas, linfócitos, macrófagos, e por células fetais, como o trofoblasto (CHAU et al., 2016; CHALLIS et al., 2009). Porém, esse perfil anti-inflamatório pode favorecer a infecção por patógenos, como *T. gondii*. Desse modo, um perfil de reposta Th1, como o desencadeado pela infecção por *T. gondii*, pode causar desequilíbrio no microambiente placentário podendo levar a complicações na gestação (SILVA; LANGONI, 2009).

A transmissão transplacentária de *T. gondii* pode ocorrer em qualquer período gestacional, mas a gravidade dos danos fetais depende significativamente da idade gestacional em que ocorreu a transmissão. Caso a gestante se infecte primariamente por *T. gondii* no primeiro trimestre da gravidez, o processo inflamatório desencadeado pela presença do parasito aumenta a probabilidade de aborto, além de possíveis alterações neurológicas fetais. Entretanto, se a primo infecção ocorrer no terceiro trimestre de

gestação a taxa de aborto é significativamente menor, contudo, a possibilidade da transmissão do patógeno para o feto é maior, porém com menores danos ao feto (HAMPTOM, 2015; BOJAR, SZYMAŃSKA, 2010).

Estudos que tentam esclarecer os processos imunológicos e bioquímicos desencadeados por células trofoblásticas para favorecer a gestação, mesmo na presença de patógenos, são frequentes. Dentre as células utilizadas para esses estudos estão as células BeWo. Essas células foram isoladas de um coriocarcionoma humano em 1968 por Pattillo e Grey. Células BeWo apresentam propriedades de células trofoblásticas humanas não tumorais. Secretam os hormônios gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio lactogênico placentário, além de citocinas como IL-6, IL-8 e IL-10 (RAMOS et al., 2008; FUJISAWA et al., 2000; ORENDI et al., 2011). Além disso, Tsui e colaboradores (2004) demonstraram que a produção de progesterona nessas células é semelhante àquela encontrada em células trofoblásticas de primeiro trimestre. Assim, considerando que a literatura dispõe de estudos nos quais células BeWo foram utilizadas como modelo experimental para infecção por *T. gondii* (BARBOSA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017; SILVA et al., 2017), podemos inferir que células BeWo infectadas com esse parasito representam uma estratégia para estudo acerca dessa infecção na interface materno-fetal.

1.6. Galectina 3 e gestação

Vários estudos descrevem a expressão de Gal-3 em tecidos placentários, incluindo as células trofoblásticas da linhagem BeWo (BOZIC et al., 2004; DALTON et al., 2007; YANG et al., 2011; HUTTER et al., 2016). Gal-3 tem um papel importante na interação do embrião com o endométrio durante a implantação já que está aumentada na fase secretora do ciclo menstrual por influência hormonal, além disso, sua expressão nas células endometriais é regulada por HCG (gonadotrofina coriônica humana (UNVERDORBEN et al., 2016; MIYAUCHI et al., 2018). A diminuição da expressão de Gal-3 no endométrio está associada a distúrbios gestacionais, por exemplo, a restrição do crescimento fetal por insuficiência placentária (FREITAG et al., 2020).

Já foi demonstrado que 17β -estradiol (E2), progesterona e HCG induzem a expressão e secreção de Gal-3 em células BeWo e que 17β -estradiol participa do processo de diferenciação das células trofoblásticas regulando a expressão de Gal-3 (YANG et al., 2011). Além disso, HCG relaciona-se com a regulação de Gal-3 para preparar o embrião para implantação no endométrio (YANG et al., 2013).

Trofoblastos extravilosos expressam Gal-3 e quando a expressão da molécula nessas células é silenciada, observa-se uma diminuição da capacidade de migração e invasão (BOJIC-TRBOJEVIĆ et al., 2019). A falta de Gal-3 durante a gestação compromete o desenvolvimento do embrião, já que estudo em trofoblasto extraviloso de placenta de restrição de crescimento intrauterino apresentou menor expressão de Gal-3, quando comparado a placentas com desenvolvimento normal (HUTTER et al. 2016). Outro papel importante da Gal-3 durante a gestação está relacionado com a apoptose de células trofoblásticas. A baixa expressão de Gal-3 nas células trofoblásticas aumenta a apoptose dessas células, o que pode estar relacionado com aborto (XIAO et al. 2019). Assim, Gal-3 é uma molécula expressa nos tecidos placentários, importante no desenvolvimento da gestação, porém, ainda não dispomos de dados sobre o papel da Gal-3 para células do microambiente placentário, bem como a proteção ou não frente a uma infecção por *T. gondii* durante a gestação.

2. Justificativa

Dentre as formas de transmissão de *T. gondii*, a transmissão vertical é uma das mais graves, uma vez que pode levar ao aborto e a mal formações fetais. A manutenção da gestação, exige uma perfeita modulação do perfil imune materno para assegurar a não rejeição do feto semi-alogênico. As células trofoblásticas têm papel preponderante na secreção de mediadores químicos envolvidos nesta modulação. Além disso, a Gal-3 em células trofoblásticas tem importante papel nas interações celulares na interface materno fetal e está relacionada com o controle da infecção por diferentes patógenos em outras populações celulares e modelos experimentais. Apesar de ser uma lectina abundante em células trofoblásticas humanas e no microambiente placentário, não há estudos que mostrem a participação funcional da Gal-3 na transmissão vertical de *T. gondii*. Assim, o presente trabalho visa contribuir para a melhor compreensão da importância da referida lectina no curso da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas (linhagem BeWo), bem como a sua participação nos mecanismos imunomoduladores operantes na toxoplasmose congênita.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da Gal-3 na infecção de células da linhagem BeWo por *Toxoplasma gondii*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão e imunolocalização de Gal-3 nas células BeWo
- Quantificar os índices de adesão, invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD (*Knockdown*);
- Avaliar o efeito de Gal-3 sobre o perfil de produção de citocinas por células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD infectadas com *T. gondii*;
- Analisar a produção de ROS em BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD infectadas com *T. gondii*;

4. Material e Métodos

4.1. Manutenção de células BeWo em cultura

Células da linhagem de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) provenientes do American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e soro fetal bovino (SFB) (10%) (Cultilab, Campinas, Brasil; inativado a 56°C / 30 min) e incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C.

As culturas de células foram mantidas por meio de passagens seriadas a cada dois dias. no momento do repique, a monocamada celular foi acrescida de meio de cultura novo e removida com tripsina. Em seguida, as células foram transferidas para tubos falcon de 15 ml e centrifugadas a 720 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura e distribuído em novas garrafas de cultura (BARBOSA et al., 2008).

4.2. Manutenção de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítas de *T. gondii*, clone 2F1, derivados da cepa RH e que expressam β-galactosidase citoplasmática, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Vern Carruthers, Medicine School of Michigan University (USA). Os taquizoítas foram mantidos por meio de passagens seriadas em células BeWo mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² contendo meio RPMI suplementado com antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 2% SFB em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Após infecção e lise das células, os taquizoítas livres nos sobrenadantes de cultura foram transferidos para tubos falcon de 15 ml, centrifugados a 720 x g por 5 minutos em temperatura ambiente e o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI e distribuído em novos frascos de cultura contendo células BeWo não infectadas (BARBOSA et al., 2015).

4.3. Inibição da expressão de Gal-3 nas células BeWo

A expressão de Gal-3 em células BeWo foi diminuída usando-se RNA de interferência (RNAi) (shRNA (h) Lentiviral Particles: SC-155994-V, Santa Cruz Biotechnology, INC), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, 1×10^6 células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com meio de cultura (1 mL/poço) contendo Polybrene (5 µg/mL; sc-134220) e infectadas com 20 µl de partículas lentivirais contendo o plasmídeo shRNA. Posteriormente, as células foram incubadas *overnight* em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C. Após o período de incubação, as células foram lavadas com meio RPMI e tratadas com 25 µg/mL de Puomicina (sc-108071) para selecionar os clones expressando shRNA. Os clones selecionados foram expandidos e testados para determinar a expressão estável de shRNA usando-se a técnica de *Western Blotting*. Os clones de células que tiveram a expressão de Gal-3 silenciada foram denominadas BeWo Gal-3 *knock-down* (BeWo Gal-3 KD) e as células com a expressão de Gal-3 preservada foram nomeadas de células BeWo Gal-3. Ambas as células foram armazenadas em freezer a - 80 °C até a data de utilização nos experimentos deste estudo.

4.4. *Western Blotting* para Gal-3

Para confirmar se a expressão de Gal-3 foi silenciada, realizamos o ensaio de Western blotting. Células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD (1×10^6 células/1000 µL/poço) foram cultivadas em placas de cultura de seis poços em meio RPMI e 10% de SFB por 24hs. Em seguida, as células foram coletadas e tratadas com tampão de lise [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% (w/v) deoxicolato de sódio e 0,1% (w/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] suplementado com inibidor de protease (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), 1mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) e fluoreto de sódio (NaF) (Sigma) e logo em seguida, as células foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C. Estes procedimentos permitiram a obtenção do lisado celular para quantificação das proteínas e detecção da Gal-3 por *Western Blotting*. As proteínas totais foram centrifugadas ($21,000 \times g$, 10 min, 4°C) e mensuradas pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, 150 µg de proteínas foram separadas de acordo com seu tamanho molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), utilizando-se como controle um Padrão de peso molecular. Posteriormente, as proteínas foram eletrotransferidas para

membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A membrana foi bloqueada para sítios inespecíficos com 4% de leite desnatado em solução salina tamponada com TRIS (TBS: 25 mM TRIS and 0.15 M NaCl, pH 7.4) por 1 h, e incubada *overnight* com o anticorpo monoclonal anti-Gal-3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ou anticorpo monoclonal anti-beta-actina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluídos em TBS, a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes, sob suave agitação, com solução salina tamponada com TRIS e, então, incubada com o anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) (1:3000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) em TBS com 2% de leite desnatado por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi novamente lavada três vezes e revelada usando-se o kit de quimioluminescência (Thermo Scientific) no ChemiDoc MP Imaging System (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) para detecção da Gal-3. A quantificação da Gal-3 foi determinada por meio da densitometria das membranas. A expressão de β -actina foi utilizada como controle. (BARBOSA et al. 2015).

4.5. Imunofluorescência para Gal-3

Após confirmação de que as células BeWo submetidas à técnica do RNAi estavam silenciadas quanto à expressão da Gal-3, a expressão de Gal-3 nas células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD também foi verificada por imunofluorescência. As células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços (3×10^4 /200 μ l/poço) e incubadas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C por 24 h. Posteriormente, as células sobre as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 1 h em temperatura ambiente, seguido de novas lavagens e incubação *overnight* com o anticorpo monoclonal anti-Gal-3 (1:50 em PGN 0,01% em solução de saponina, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States) no escuro a 4 °C. Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com IgG anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488 (fluorocromo verde) e TO-PRO-3 (fluorocromo azul) (Invitrogen Califórnia, EUA) (1:500 em PGN-0.01% de solução de saponina) simultaneamente por 1 h no escuro a 4 °C para marcar Gal-3 e o núcleo, respectivamente. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro e as imagens capturadas em microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 200 M). As imagens foram

analisadas usando-se software de microscopia de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany) (COSTA et al. 2019).

4.6. Ensaios de invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*

As células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD (3×10^4 células/200 μ L/poço) foram cultivadas em microplacas de cultura de 96 poços contendo meio RPMI e 10 % de SFB e mantidas por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas na proporção de 5 taquizoítas do clone 2F1 da cepa RH de *T. gondii* por célula em meio RPMI e 2% de SFB por 3 h, para avaliar a invasão de *T. gondii* (BARBOSA et al., 2012) ou por 24 h para avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* (CASTRO et al. 2013). Após o período de infecção, as placas foram centrifugadas (720 x g, 10 min, 25 °C) e os sobrenadantes livres de células foram coletados e armazenados em freezer a – 80 °C para posterior análise do perfil de citocinas. As células foram, então, lisadas e a proliferação intracelular foi quantificada através do ensaio colorimétrico da β -galactosidase (TEO et al., 2007; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2015). Nesse ensaio, após a lise celular, os parasitos da cepa 2F1 de *T. gondii* livres no sobrenadante são expostos ao reagente CPRG. A enzima citoplasmática β -galactosidase, expressa pelos taquizoítas do clone 2F1, converte o substrato CPRG (clorofenol red – β – D – galactopiranosídeo; Roche) de coloração amarelo-laranja em galactose e o cromóforo vermelho clorofenol, desenvolvendo-se uma coloração vermelho-escuro no meio. A intensidade de cor corresponde, portanto, à atividade enzimática da β -galactosidase e constitui uma medida indireta para a determinação quantitativa do número de parasitos.

A proliferação e invasão intracelular de *T. gondii* (número total de taquizoítas) foi obtida relacionando-se o número de taquizoítas obtidos com uma curva padrão de referência contendo taquizoítas livres (1×10^6 a 15.6×10^3). Os dados foram expressos como número de taquizoítas e foram realizados três experimentos independentes com nove replicadas.

4.7. Ensaio de adesão de *T. gondii* às células BeWo não é infecção – entrou em contato com parasito

Para verificar se Gal-3 interfere na adesão de *T. gondii* nas células BeWo, fizemos o ensaio de adesão de acordo com OLIVEIRA et al, 2006 e BORGES et al., 2016, com algumas alterações. Para o ensaio de adesão, células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD

($3 \times 10^4/200 \mu\text{l/poço}$) foram plaqueadas sob lamínulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços por 24 hs. Depois de aderidas, as células foram fixadas com paraformoldeído (4%) por 30 minutos em temperatura ambiente e depois lavadas com PBS 1x. Em seguida, as células foram infectadas na proporção de 5 taquizoítas do clone 2F1 da cepa RH de *T. gondii* por célula em meio RPMI e 2% de SFB por três horas. Os taquizoítas que não aderiram nas células foram removidos após lavar a placa com PBS 1x e as lamínulas foram incubadas “overnight” com o anticorpo primário monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* (SAG1/p30) (diluído na concentração de 1:500 em solução de PGN-0,01 % saponina). As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com IgG anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488 (diluído na concentração de 1:500 em solução de PGN-0,01 % saponina) e com TO-PRO-3 (Invitrogen Califórnia, EUA) (1:500 em PGN-0,01% de solução de saponina) por 1 h no escuro a 4 °C para marcar *T. gondii* e o núcleo, respectivamente. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro e as imagens capturadas em microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 200 M). Foram contados a quantidade de células com parasitos aderidos em 60 campos capturados de forma aleatória e esse dado foi expresso na forma de porcentagem de adesão de *T. gondii*, relacionando-se a quantidade de células com parasitos aderidos pela quantidade total de células em cada campo analisado.

4.8. Detecção de citocinas

Os sobrenadantes coletados após a infecção das células e armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ foram utilizados para quantificação de citocinas pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Microplacas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-IFN γ , anti-IL-6, anti-IL-8 e anti-IL-10 (R&D Systems Mineapolis, EUA), *overnight* à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com TBS-Tween 0,05% e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito pela adição de PBS contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) e incubação por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os sobrenadantes das células por 2 h à temperatura ambiente. Depois de lavadas, as placas foram incubadas com os respectivos anticorpos de detecção para as citocinas analisadas por 2 h à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H_2O_2 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). (Polyscience Ink, Warrington, PA). A DO foi determinada em leitora de microplacas (Titerket[®] multiskan plus) a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com

a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA).

4.9. Mensuração da produção de ROS

Para quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), células BeWo Gal-3 e Bewo Gal-3 KD foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/1000 μL /poço) por 24 h em meio RPMI contendo 10% de SFB em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii* (5 parasitos por célula) e incubadas novamente por 24 h em meio RPMI a 10% SFB em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Posteriormente, as células foram removidas dos poços, centrifugadas a 2500 g, 5 min. Após serem lavadas com PBS, as células foram incubadas com 20 μM 5-(6)-chloromethyl-2',7'dichlorodihydrofluoresceína diacetato acetyl ester (CM-H2DCFDA) (Invitrogen) por 30 min no escuro e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Para verificar se as células que produziram ROS estavam viáveis ou mortas, 2 μL de PI (iodeto de propídio) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionados às amostras. A produção de EROs foi analisada por citometria de fluxo, em citômetro Cytoflex (Backman Coulter, EUA) com contagem mínima de 10.000 eventos por amostra (BeWo Gal-3 ou BeWo Gal-3 KD infectadas ou não). Os dados foram obtidos pelo software FlowJo (versão 7.6.3) e expressos como porcentagem de células marcadas (COSTA et al. 2019).

4.10. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média; *mean standard error*) e as diferenças entre os grupos foram analisadas com os testes *t* de Student, One-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis quando apropriado. Todos os dados foram analisados no software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Silenciamento da expressão da Gal-3 em células BeWo

Após a técnica de shRNAi, a redução da expressão de Gal-3 foi verificada por *Western Blotting* e confirmada pela imunofluorescência. Os dados obtidos mostraram que a expressão de Gal-3 foi reduzida em células BeWo submetidas à técnica do RNAi, quando comparamos com as células BeWo não silenciadas (**Figura 1A**). A redução da expressão da Gal-3 também foi verificada por imunofluorescência (**Figuras 1B – C**). Dessa maneira, neste estudo foram utilizadas células BeWo com expressão reduzida de Gal-3 (células BeWo Gal-3 KD) e células BeWo expressando Gal-3 (BeWo Gal-3).

5.2. Gal-3 diminui a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo

Para verificar se Gal-3 interfere na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo, ambas as linhagens de células, BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD, foram infectadas e a proliferação intracelular avaliada pelo ensaio da β -galactosidase. Foi observado que a proliferação intracelular de *T. gondii* foi menor em células BeWo Gal-3, quando comparadas com as células BeWo Gal-3 KD (**Figuras 2**). Estes dados sugerem que Gal-3 pode estar envolvida no controle da proliferação de *T. gondii* em células BeWo.

5.3. Gal-3 diminui a invasão e adesão de *T. gondii* nas células BeWo

Para ao efeito de Gal-3 sobre a proliferação intracelular de *T. gondii*, em células BeWo, avaliamos as taxas de adesão e invasão de *T. gondii* em células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD. por imunofluorescência e reação de β -galactosidase, respectivamente, após 3 h de infecção. Os dados obtidos mostraram que a porcentagem de parasitos aderidos às células BeWo Gal-3 é menor que nas células BeWo Gal-3 KD (**Figuras 3A e 6**), como pode ser observado nas imagens de imunofluorescência, nas quais verifica-se menor quantidade de taquizoítas na superfície das células BeWo Gal-3 (**Figura 3C**), em comparação às células BeWo Gal-3 KD (**Figura 3D**). Em relação à taxa de invasão, o mesmo fenômeno foi observado, ou seja, a taxa de invasão foi menor em células BeWo Gal-3 (**Figura 3B**). As menores taxas de adesão e de invasão em células BeWo Gal-3 sugerem que Gal-3 controla a proliferação intracelular de *T. gondii*, pelo menos em parte, interferindo com o mecanismo de entrada do parasito na célula hospedeira.

5.4. Gal-3 interfere no perfil de citocinas produzidas por células BeWo

O perfil de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-6, IL-8) e anti-inflamatórias (IL-10) produzidas por células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD foi avaliado para verificar possíveis diferenças relacionadas à presença da Gal-3, as quais poderiam explicar o efeito desta lectina sobre a proliferação intracelular de *T. gondii*. Níveis significativos de IFN- γ , IL-8 e IL-10 foram detectados apenas em sobrenadantes de células BeWo Gal-3 KD; ao contrário, após infecção com *T. gondii*, células BeWo Gal-3 apresentaram maior produção dessas citocinas, quando comparadas às células BeWo Gal-3 KD. (**Figuras 4A, 4C e 4D**).

Por outro lado, os níveis de IL-6 foram significativamente maiores em sobrenadantes das células BeWo Gal-3, comparados às células BeWo Gal-3 KD, independentemente da infecção com *T. gondii* (**Figura 4B**). Juntos, esses achados indicam que na ausência de infecção por *T. gondii*, Gal-3 está associada a um baixo nível de ativação das células BeWo, com produção basal de citocinas. Entretanto, em células BeWo infectadas, Gal-3 parece contribuir para a secreção de citocinas importantes na resposta imune celular contra o patógeno.

5.5. Gal-3 não altera a produção de ROS em células BeWo

A geração de ROS representa uma ferramenta celular com potencial microbicida importante na eliminação de patógenos. Assim, a produção de ROS em células BeWo foi analisada para verificar se Gal-3 modula esta via metabólica como parte do mecanismo para controle da infecção por *T. gondii* nessas células. Os dados obtidos mostraram que em ambas as linhagens, células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD, a produção de ROS foi menor em células infectadas (**Figuras 5A e 5B**). Quando comparamos a produção de ROS entre células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD, não houve diferença estatística significativa. Assim, a redução da produção de ROS em células BeWo infectadas parece estar relacionada com mecanismos modulados pelo parasito, independentemente de Gal-3.

6. Discussão

Gal-3 é uma lectina de mamíferos ligante de β -galactosídeos com diversas funções nas células, dentre elas, a manutenção e sucesso da gestação, uma vez que está envolvida na implantação, embriogênese e formação da placenta (YANG et al., 2011; YANG et al., 2013). Além disso, já foi verificado que Gal-3 apresenta papel importante durante infecções por protozoários como *T. gondii* e *T. cruzi* (ALVES et al., 2010; ALVES et al., 2013; SILVA et al., 2017; CHAIN et al., 2020). Infecções por patógenos intracelulares, como *T. gondii*, podem comprometer o equilíbrio entre respostas pró e anti-inflamatórias necessário durante a gestação (MAUBON et al., 2008; CHALLIS et al., 2009). Nesse sentido, faz-se mister identificar e compreender o papel de possíveis moléculas envolvidas no controle de infecções intracelulares durante o período gestacional, as quais podem comprometer o desenvolvimento fetal e o sucesso da gestação. Assim, este é o primeiro estudo a investigar o papel da Gal-3 durante a infecção por *T. gondii* utilizando uma linhagem de células da placenta humana, derivadas de coriocarcinoma (células BeWo) (PATTILLO & GREY, 1968), como modelo experimental que, pelo menos em parte, mimetiza a interface materno-fetal.

Os achados obtidos neste estudo mostraram que Gal-3 em células BeWo está associada a taxas reduzidas de adesão, invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*. A literatura tem revelado que Gal-3 reconhece glicoproteínas e glicolipídios expressos na superfície de patógenos, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (PELLETIER & SATO, 2002; VAN DEN BERG et al., 2004; KOHATSU et al., 2006; PINEDA et al., 2015). Gal-3 é responsável por reconhecer lipofosfoglicanos presentes na superfície de *L. major*, sugerindo que a molécula pode contribuir para uma resposta imune específica contra leishmaniose (PELLETIER & SATO, 2002). Outro estudo demonstrou que Gal-3 reconhece glicanos presentes em *S. mansoni*, o que pode ser um padrão para o reconhecimento imunológico do parasito mediado por essa galectina (VAN DEN BERG et al., 2004). Além disso, Gal-3 reconhece o parasito *T. cruzi* e dessa forma proporciona a morte do parasito. Essa molécula aparenta ter tanta importância no controle de *T. cruzi* que o próprio parasito, para evadir dos mecanismos imunológicos desencadeados por Gal-3 durante a infecção, altera a estrutura molecular da galectina, anulando assim os mecanismos de sinalização associados à imunidade inata que são desencadeados por esta leucina (PINEDA et al., 2015; PINEDA et al., 2020).

Durante a infecção por *T. gondii*, Gal-3 expressa em macrófagos reconhece glicosilfosfatidilinosídeos (GPIs) na superfície do protozoário, uma interação necessária para gerar uma resposta imune contra o parasito (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010). A ligação de Gal-3 aos GPIs de *T. gondii*, induz a produção de TNF- α nos macrófagos infectados pelo parasito e, além disso, Gal-3 pode agir como um co-receptor, apresentando os GPIs para TLRs em macrófagos (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010). Após a infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, camundongos Gal3^{-/-} exibem uma carga parasitária maior, recrutamento diminuído de monócito/macrófagos e neutrófilos, resposta inflamatória retardada no sistema nervoso central e concentrações significativamente maiores de IL-12p40 e IFN γ no soro em comparação com os de camundongos Gal3^{+/+}, sugerindo que Gal-3 é uma molécula importante no curso de uma resposta imune para controle da proliferação de *T. Gondii* (BERNARDES et al., 2006). A expressão de Gal-3 está aumentada em células de micróglia de camundongos e está relacionado às respostas imunes Th2 e M1 / M2, em camundongos C57BL / 6 infectados com *T. gondii* e à imunidade Th1 e M2 em camundongos BALB / c com infecção crônica por *T. gondii*. Assim, Gal-3 pode desenvolver uma resposta imune diferente de acordo com o modelo experimental adotado (LIU et al., 2018). Estudos também demonstraram que a viabilidade de neutrófilos peritoneais de camundongos aumenta após infecção *in vitro* com *T. gondii*, ao mesmo tempo em que parâmetros de citotoxicidade associada à infecção diminuem, tais como a liberação das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e lisozima, bem como a geração de ROS induzida por PMA (*phorbol myristate acetate*) (ALVES et al., 2010). Diante do exposto acima, os resultados encontrados neste trabalho corroboram com aqueles da literatura, uma vez que em células BeWo com expressão reduzida de Gal-3 houve aumento da proliferação intracelular de *T. gondii*, sugerindo então que essa lectina exerce um papel importante no controle da infecção pelo parasito na interface materno-fetal.

Para verificar se Gal-3 exerce alguma influência no perfil da resposta imune em células BeWo, algumas citocinas foram analisadas. Observamos que a infecção por *T. gondii* induz a produção de IFN- γ em células BeWo expressando Gal-3, contudo, na ausência desta lectina, após a infecção, não houve produção de IFN- γ . Uma correlação entre a expressão de Gal-3 e os níveis de IFN- γ durante a infecção por *T. gondii* já foi demonstrada em modelo experimental *in vivo*. Camundongos com expressão fisiológica da Gal-3 apresentaram maior expressão de IFN- γ quando estavam infectados por *T. gondii* (LIU et al., 2018). A citocina IFN- γ é uma das mais importantes envolvida na resposta

imune contra *T. gondii* (LANG et al., 2007; DENKERS et al., 2010). No entanto, já foi demonstrado que em células BeWo essa citocina não é capaz de controlar o parasitismo (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). Assim, provavelmente a menor proliferação intracelular de *T. gondii*, observada em células BeWo infectadas não está relacionada com IFN- γ . Contudo, vale ressaltar que esta foi a primeira demonstração da importância da Gal-3 para a produção dessa citocina em células trofoblásticas humanas infectadas por *T. gondii*.

IL-8 ou CXCL-8 está relacionada à migração, proliferação celular e associada à resposta imune inata contra patógenos intracelulares, como *T. gondii* (CASTILLO et al., 2017; KANY et al., 2019; PARK et al., 2019). No presente estudo, células BeWo Gal-3 infectadas com *T. gondii* aumentaram a produção de IL-8. Este achado corrobora com vários estudos, *in vivo* e *in vitro*, os quais demonstraram que durante a infecção por *T. gondii*, a expressão de IL-8 é aumentada (MACHADO et al., 2020; MILIAN et al., 2019; PEREIRA et al., 2019; PARK et al., 2019). Isso também é observado durante a gestação, já que mulheres grávidas infectadas com *T. gondii* apresentaram níveis aumentados de IL-8 (NEJAD et al., 2011). De modo semelhante, a infecção por *T. gondii* também induziu a produção de IL-8 em explantes de vilos placentários humanos (CASTILLO et al., 2017). Além disso, o trofoblasto extraviloso infectado pelo parasito aumenta a produção de IL-8 (MILIAN et al., 2019). Interessantemente, Gal-3 também pode induzir a expressão de IL-8, como demonstrado em estudo utilizando células HTR-8 e, após o tratamento com Gal-3 exógena, a expressão do mRNA para IL-8 foi aumentada (MIYAUCHI et al., 2018). No presente trabalho, Gal-3 aumentou a produção de IL-8 somente em células BeWo Gal-3 infectadas, uma vez que na ausência de infecção, níveis maiores de IL-8 foram detectados em sobrenadantes de células BeWo Gal-3 KD. Desta maneira, a redução da produção de IL-8 em células BeWo Gal-3 KD infectadas com *T. gondii*, como evidenciado em nossos resultados, pode estar relacionada à redução da expressão da Gal-3 nas células.

Em células BeWo, Gal-3 também é necessária para aumento da expressão de IL-6, já que na sua ausência os níveis dessa citocina são reduzidos, independentemente de infecção. IL-6 tem papel importante em processos inflamatórios, promove a diferenciação de linfócitos T e B, está envolvida em inflamação ocular e no controle de infecções por parasitos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major* (MIRPURI & YAROVINSKY, 2012; TANAKA et al., 2014; GHASEMI et al., 2017; SANMARCO et al., 2017; OUALHA et al., 2019). Além disso, essa citocina é importante durante a

invasão e implantação do embrião no útero, sendo expressa em citotrofoblasto e em trofoblasto extraviloso (CHAPION et al., 2012). Estudos prévios demonstraram também que IL-6 está aumentada em células infectadas por *T. gondii* e que é importante para prevenir a transmissão vertical do parasito (BARBOSA et al., 2015; SILVA et al., 2017; GOMES et al., 2018).

Em camundongos infectados por *T. gondii* já foi observada que existe uma correlação entre a presença de Gal-3 e maior expressão de RNAm para IL-10 (LIU et al., 2018). Neste estudo, níveis aumentados de IL-10 foram encontrados em sobrenadantes de células BeWo Gal-3 KD na ausência de infecção. Ao contrário, após infecção por *T. gondii*, células BeWo Gal-3 secretam quantidades maiores de IL-10. Como já foi demonstrado que em células BeWo IL-10 favorece uma maior proliferação intracelular de *T. gondii* (BARBOSA et al. 2008; BARBOSA et al. 2015), a maior proliferação intracelular do parasito observada na ausência de Gal-3 em células BeWo parece não estar relacionada com essa citocina.

A expressão da Gal-3 em células BeWo não influenciou a produção de ROS. No entanto, após a infecção houve uma redução da produção de ROS em ambas as linhagens celulares, BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD. Gal-3 é essencial para produção de ROS em neutrófilos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* por *T. gondii* (ALVES et al., 2013), porém isto não foi observado neste trabalho com células trofoblásticas. A produção de ROS é um dos mecanismos pelos quais a via das MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) é ativada e, assim, as quinases ERK, JNK e p38 ativam a via do NF- κ B (factor nuclear kappa B), a qual, por sua vez, induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias, dentre elas IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP-9 e COX-2 (JALMI & SINHA, 2015; AGGARWAL et al., 2019). Dessa forma, provavelmente a redução na geração de ROS observada em células BeWo infectadas trata-se de um mecanismo do parasito para evitar a resposta imune inflamatória do hospedeiro. Isso já foi demonstrado em células de retina humana, nas quais a infecção por *T. gondii* é capaz de ativar vias que levam à redução da produção de ROS para favorecer sua permanência e proliferação nas células (ZHOU et al., 2013).

Diante do exposto, de modo geral, durante infecção por patógenos intracelulares, como *T. gondii*, Gal-3 tem importante papel pró-inflamatório, na ativação de células da defesa inata e no controle da proliferação intracelular do parasito (BERNARDES et al., 2006; ALVES et al., 2013; LIU et al., 2018). Na interface materno-fetal, Gal-3 está presente em células trofoblásticas e contribui para o desenvolvimento da gestação (YANG et al., 2011; HUTTER et al., 2016; FREITAG et al., 2020). Nesse sentido, nossos

resultados mostraram pela primeira vez que Gal-3 modula eventos de adesão, invasão e proliferação, bem como perfil de citocinas secretadas em células trofoblásticas da linhagem BeWo durante a infecção por *T. gondii* e, portanto, influencia no controle do parasitismo (**Figura 6**). Contudo, ainda são necessários estudos que investiguem quais mecanismos essa lectina utiliza para desempenhar esse papel no microambiente placentário a fim de que possamos compreender a sua função no controle da transmissão vertical do parasito.

7. Conclusões

Os dados obtidos em nosso trabalho sugerem que:

- Gal-3 está relacionada ao controle da proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo;
- Gal-3 proporciona diminui a adesão e invasão de *T. gondii* em células BeWo;
- Gal-3 está relacionada aos níveis aumentados de IL-6 em sobrenadantes das células BeWo, independentemente da infecção por *T. gondii*;
- Gal-3 não induz a produção de ROS em células BeWo, independentemente de infecção por *T. gondii*.

8. Referências Bibliográficas

ALVES, C.M., SILVA, D.A., AZZOLINI, A.E. et al. Galectin-3 plays a modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. *Immunobiology*. v. 215, p. 475-85, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.08.001>

ALVES, C.M., SILVA, D.A., AZZOLINI, A.E., et al. Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. v. 140, p. 210-9, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001473>

BAMBOUSKOVA, M., POLAKOVICOVA, I., HALOVA, I., et al. New regulatory roles of galectin-3 in high-affinity IgE receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* v. 36, p.1366-82, 2016. <https://doi.org/10.1128/MCB.00064-16>

BARBOSA, B.F., GOMES, A.O., FERRO, E.A., ET AL. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. *Vet Parasitol*, v. 187, p. 44-52, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.039>

BARBOSA, B. F., LOPES-MARIA, J. B.; GOMES, A. O., et al. IL10, TGF Beta1, and IFN Gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. *Biol. of Reprod.* v. 92, p. 82-82, 2015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>

BARRAGAN, A.; HITZIGER, N. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. *Subcell Biochem.* v. 47, p.198-207, 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_16

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. *Am J Pathol.* v.168, p. 1910-20, 2006. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050636>

BLADER, I.J., COLEMAN, B.I., CHEN, C.T., GUBBELS, M.J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years later. *Annu Rev Microbiol*, v.69, p.463-485, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BLOIS, S.M., ILARREGUI, J.M., TOMETTEN, M., et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med.*, v.13, p. 1450-7, 2007. <https://doi.org/10.1038/nm1680>

BLOIS, SM, CONRAD ML, FREITAG N, BARRIENTOS G. Galectins in angiogenesis: consequences for gestation. *J. Reprod. Immunol.*, v. 108, p. 33-41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.12.001>

BOJAR, I.; SZYMAŃSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* - state of the art. *Ann Agric Environ Med*, v.17, p. 209-14, 2010.

BOJIĆ-TRBOJEVIĆ, Ž., JOVANOVIĆ KRIVOKUĆA, M., VILOTIĆ, A, et al. Human trophoblast requires galectin-3 for cell migration and invasion. *Sci Rep.*, v. 9, p.2136, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38374-w>

BOUGHATTAS, S., ABDALLAH, R.B., SIALA, E., et al. An atypical strain associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia. *New Microbiol.*, v.34, p.413-416, 2011.

BORGES, I.P., CASTANHEIRA, L.E., BARBOSA, B.F., et al. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. *Toxicon*. v. 94, p.84-91, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.010>

BOZIĆ, M., PETRONIJEVIĆ, M., MILENKOVIĆ, S., et al. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta*, v.25, p.798-802, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.03.006>

BRINCHMANN, M.F., PATEL, D.M., IVERSEN, M.H. The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. *Mediators Inflamm*, 2018:9186940, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9186940>

CASSAGLIA, P., PENAS, F., BETTAZZA, C., et al. Genetic deletion of galectin-3 altered the temporal evolution of macrophage infiltration and healing affecting the cardiac remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Pathol.*, v. 20, p. 30253-4, 2020.

CASTRO, A.S., ALVES, C.M., ANGELONI, M.B., et al. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta*, v. 34, p. 240-247, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.006>

CHAIN, M.O, AUGUSTO, C.M.P., OLIVEIRA I.M., et al. Galectin-3 mediates survival and apoptosis pathways during *Trypanosoma cruzi*-host cell interplay. *Exp Parasitol*. doi:10.1016/j.exppara.2020.107932, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107932>

CHALLIS, J. R., LOCKWOOD, C. J., MYATT, L., NORMAN, J. E., STRAUSS, J. F. 3rd, PETRAGLIA, F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*, v.16, p.206-15, 2009. <https://doi.org/10.1177/1933719108329095>

CHAU, A., MARKLEY, J.C., JUANG, J., TSEN, L.C. Cytokines in the perinatal period - Part II. *Int J Obstet Anesth*, v.26. p. 48-58, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijoa.2015.12.006>

CHEN, S.C., KUO, P.L. The role of galectin-3 in the kidneys. *Int J Mol Sci*, v. 4, p.565, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17040565>

CHENG, Y.L., WU, Y.W., KUO, C.F, et al. Galectin-3 inhibits galectin-8/parkin-mediated ubiquitination of group A Streptococcus. *mBio.*, v. 4., e00899-17, 2017. <https://doi.org/10.1128/mBio.00899-17>

CHOU, F.C., CHEN, H.Y., KUO, C.C., SYTWU, H.K. Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. *Int J Mol Sci.*, v.19, p. 430, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19020430>

DALTON, P., CHRISTIAN, H.C., REDMAN, C.W., et al. Membrane trafficking of CD98 and its ligand galectin 3 in BeWo cells--implication for placental cell fusion. *FEBS J*, v.274, n°11, p.2715-2727, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05806.x>

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., NIEHUS, S., CODDEVILLE, B., et al. Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. *J Biol Chem.*, v. 43, p. 32744-32750, 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.137588>

DOWSE, T.; SOLDATI, D. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol.*, v., p. 388-396, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.013>

DRAGOMIR, A.C., SUN, R., CHOI, H., LASKIN, J.D., LASKIN, D.L. Role of galectin-3 in classical and alternative macrophage activation in the liver following acetaminophen intoxication. *J Immunol.*, v. 12, p. 5934-5941, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201851>

DUBEY, J.P., LAGO, E.G., GENNARI, S.M., et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.*, v. 11, p.1375-1424, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

DUMIC, J., DABELIC, S., FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, v.1760, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.020>

DUPONT, C.D., CHRISTIAN, D.A., HUNTER, C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol*, v.34, p.793-813, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>

ELMORE, S.A., JONES, J.L., CONRAD, P.A., et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol*, v.26, p.190-196, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità*, v. 40, p. 71 - 80, 2004.

FICHOROVA, R.N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *J Reprod Immunol.*, v. 83, p.185-9, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.08.007>

FOWLER, M., THOMAS, R.J., ATHERTON, J., et al. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. *Cell Microbiol.*, v.8, p44-54, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00599.x>

FRANCO, P. S., SILVA, N. M., BARBOSA, B. F., et al. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. *Front. Microbiol.*, v. 6, p. 1-13, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00181>

FRANCO, P.S.; RIBEIRO, M.; LOPES-MARIA, J.B., et al. Experimental infection of *Calomys callosus* with atypical strains of *Toxoplasma gondii* shows gender differences in severity of infection. *Parasitol Res*, v.113, p.2655-2664, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3920-y>

FRANCO, P.S., GOIS, P.S.G, ARAÚJO, T.D., et al. Brazilian strains of *Toxoplasma gondii* are controlled by azithromycin and modulate cytokine production in human placental explants. *J. Biomed. Sci.*, v. 26, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0503-3>

FREITAG, N., TIRADO-GONZALEZ, I., BARRIENTOS, G., et al. Galectin-3 deficiency in pregnancy increases the risk of fetal growth restriction (FGR) via placental insufficiency. *Cell Death Dis.*, v.11, p.560, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02791-5>

FISCH, D., CLOUGH, B., FRICKEL, E.M. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.*, v.15, e1008097, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008097>

GALAL, L., HAMIDOVIĆ, A., DARDÉ, M.L., MERCIER, M. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food Waterborne Parasitol.*, v.15, e00052, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00052>

GIGLEY, J. P.; BHADRA, R.; KHAN, I. A. CD8 T cells and *Toxoplasma gondii*: a new paradigm. *J Parasitol Res*, v.2011, p. 1-9, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/243796>

GILSON, R.C., GUNASINGHE, S.D., JOHANNES, L., GAUS, K. Galectin-3 modulation of T-cell activation: mechanisms of membrane remodelling. *Prog Lipid Res.*, doi:10.1016/j.plipres.2019.

GRIFFIOEN, A.W., THIJSSSEN, V.L. Galectins in tumor angiogenesis. *Ann Transl Med.*, v. 2, p. 90, 2014.

HAMPTON, M.M.. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal Netw*, v.34, n°5, p.274-278, 2015. <https://doi.org/10.1891/0730-0832.34.5.274>

HARKER, K.S.; UENO, N.; LODOEN, M.B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol*, v.37, n°3, 2015. <https://doi.org/10.1111/pim.12163>

HASSAN, M.A., OLJNIK, A.A., FRICKEL, E.M., SAEIJ, J.P. Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *Int J Parasitol.*, v.49, p.63-70, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.08.007>

HILL, R.D.; SU, C. High tissue burden of *Toxoplasma gondii* is the hallmark of acute virulence in mice. *Vet Parasitol*, v.187, p.36-43, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.001>

HISRICH, B.V., YOUNG, R.B., SANSONE, A.M., et al. Role of human galectins in inflammation and cancers associated with endometriosis. *Biomolecules*. v., p. 230., 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10020230>

HO, M.K., SPRINGER, T.A. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol.*, v.128, p.1221-1228, 1982.

HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.*, v.172, p.1561-1566.1995. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

HU, Y.; YÉLÉHÉ-OKOUMA, M.; EA, H.K., et al.. Galectin-3: A key player in arthritis. *Joint Bone Spine*, v.319, p.30051-30056, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.02.029>

HUTTER, S.; KNABL, J.; ANDERGASSEN, U., et al. Placental expression patterns of galectin-1, galectin-2, galectin-3 and galectin-13 in cases of intrauterine growth restriction (IUGR). *Int J Mol Sci*, v.17, p.523, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17040523>

HWANG, S.; KHAN, I.A. CD8+ T cell immunity in an encephalitis model of *Toxoplasma gondii* infection. *Semin Immunopathol*, v.37, p.271-279, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0483-7>

IACOBINI, C., BLASETTI FANTAUZZI, C., BEDINI, R., et al. Galectin-3 is essential for proper bone cell differentiation and activity, bone remodeling and biomechanical competence in mice. *Metabolism.*, v.83, p.149-158, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.02.001>

ISMAIL, H., KANG, B.H., KIM, J.S., et al. IL-12 and IL-23 Production in *Toxoplasma gondii*- or LPS-Treated Jurkat T Cells via PI3K and MAPK Signaling Pathways. *Korean J Parasitol.*, v.55, p. 613-622, 2017. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.6.613>

IVANOVA, D.L., MUNDHENKE, T.M., GIGLEY, J.P. The il-12- and il-23-dependent nk cell response is essential for protective immunity against secondary *Toxoplasma gondii* infection. J Immunol., v. 203, p. 2944-2958, 2019. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801525>

JOHN, C.M., JARVIS, G.A., SWANSON, K.V., et al. Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected. Cell Microbiol., v.4, p.649-62, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00219.x>

JIANG, X.N., DANG, Y.F., GONG, F.L., GUO, X.L. Role and regulation mechanism of Gal-3 in non-small cell lung cancer and its potential clinical therapeutic significance. Chem Biol Interact., v.309, p.108724, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108724>

JULIANO, P.B.; BLOTTA, M.H.; ALTEMANI, A.M. ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. Placenta, v.27, p.750-7, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.07.008>

KHAN, A.; DUBEY, J.P.; SU,C.; et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. Int J Parasitol., v. 41, p. 645-655, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.005>

KOCHANOWSKY, J.A., KOSHY, A.A. *Toxoplasma gondii*. Curr Biol., v. 28, p.770-771, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.035>

KOGA, K.; ALDO, P. B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. J Obstet Gynaecol Res., v. 35, p. 191-202, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x>

KOHATSU, L., HSU, D.K., JEGALIAN, A.G, et al. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. J Immunol., v. 177, p. 4718-4726, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4718>

KÖRNER, H.; MCMORRAN, B.; SCHLÜTER, D.; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. Int J Parasitol, v. 40, p. 879-88, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.03.011>

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. Pharmacol Rep, v.61, p.22-32, 2009. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70004-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70004-0)

LIMA, T.S., LODOEN, M,B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. Front Cell Infect Microbiol., v.9, p. 103, 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00103>

LIU, F.T. Regulatory roles of galectins in the immune response. Int Arch Allergy Immunol, v.136, p.385-400, 2005. <https://doi.org/10.1159/000084545>

LIU ,F.T, RABINOVICH, G.A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1183, p.158-82. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x>

LIU, J., HUANG, S., LU, F. Galectin-3 and Galectin-9 may differently regulate the expressions of microglial M1/M2 markers and T Helper 1/Th2 cytokines in the brains of genetically susceptible C57BL/6 and resistant BALB/c mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Front Immunol.*, v. 9, p.1648, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01648>

LU, H., LIU, Y., WANG, D., et al. Galectin-3 regulates metastatic capabilities and chemotherapy sensitivity in epithelial ovarian carcinoma via NF- κ B pathway. *Tumour Biol.*, v.37, p. 11469-77, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5004-3>

LUK, H.M., WANG, D,Y, XIE, L.L., et al.. Expression and clinical significance of Gal-3 and NF κ B pathway-related factors in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.*, v.13, p.1197-1205, 2020.

MA, X.; YAN, W.; ZHENG, H.; et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res.*, v.17, 2015. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7010.1>

MACHADO, L.F., SANFELICE, R.A., BOSQUI, L.R., et al. Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of *Toxoplasma gondii* RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction. *Exp Parasitol.*, v. 211, p. 107853, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107853>

MAUBON, D.; AJZENBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M-P.; et al. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol*, v. 24, p. 299-303, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.03.012>

MEISSNER, M., REISS, M., VIEBIG, N., et al. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci.*, v. 115, p.563-574, 2002.

MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M.F. Toxoplasma secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol.*, v.31, p.60-71, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.002>

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; KIN, R..J.; SMITH, N.C..The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, v.39, p. 23-39, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>

MISHRA, A., BEHURA, A., MAWATWAL, S., et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem Toxicol.*, v. 134, p. 110827, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESA, M.M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. Immunol Rev, v. 240, p. 269-85, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x>

NAM, H. W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. Korean J Parasitol, v. 47, p. 29-37, 2009. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.S.S29>

NITA-LAZAR, M.; BANERJEE, A.; FENG, C.; VASTA, G.R. Galectins regulate the inflammatory response in airway epithelial cells exposed to microbial neuraminidase by modulating the expression of SOCS1 and RIG1. Mol Immunol., v.68, p.194-202, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.08.005>

OLIVEIRA, J. G., SILVA, N.M., SANTOS, A. A. D., et al. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. Placenta, v.27, p.691-698, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.06.006>

OLIVEIRA, F.L., SANTOS, S.N., RICON, L., et al. Lack of galectin-3 modifies differentially Notch ligands in bone marrow and spleen stromal cells interfering with B cell differentiation. Sci Rep., v.8, p.3495, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21409-7>

ORENDI, K.; KIVITY, V.; SAMMAR, M., et al. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. Placenta, v.32, p.49-54, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.023>

PACHECO, N.S., TOSETTI, N., KORENY, L., et al. Evolution, Composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa. Trends Parasitol., v.20, p. 30129-X, 2020.

PAPASPYRIDONOS, M., MCNEILL, E., DE BONO, J.P., et al. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. Arterioscler Thromb Vasc Biol., v.28, p. 433-40, 2008. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159160>

PARK, A.M.; HAGIWARA, S.; HSU, D.K., et al. Galectin-3 plays an important role in innate immunity to gastric infection by *Helicobacter pylori*. Infect Immun, v.84, p.1184-1193, 2016. <https://doi.org/10.1128/IAI.01299-15>

PARK, E.A., HAN, I.H., KIM, J.H., et al. Production of inflammatory cytokines and nitric oxide by human mast cells incubated with *Toxoplasma gondii* lysate. Korean J Parasitol., v.57, p. 201-206, 2019. <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.2.201>

PATTILLO, R.A., GEY, G.O. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. Cancer Res, v.28, p.1231-1236, 1968.

PELLETIER, I., SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem.*, v. 277, p. 17663-17670, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201562200>

PEREIRA, A.C.A., SILVA, R.J., FRANCO, P.S., et al. Cyclooxygenase (cox)-2 inhibitors reduce *Toxoplasma gondii* infection and upregulate the pro-inflammatory immune response in *Calomys callosus* rodents and human monocyte cell line. *Front Microbiol.*, v. 10, p. 225, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00225>

PEREIRA, J.X., SANTOS, S.N., PEREIRA, T.C., et al. Galectin-3 regulates the expression of tumor glycosaminoglycans and increases the metastatic potential of breast cancer. *J Oncol.*, v.2019, p. 9827147, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9827147>

PINEDA, M.A., CORVO, L., SOTO, M., et al. Interactions of human galectins with *Trypanosoma cruzi*: binding profile correlate with genetic clustering of lineages. *Glycobiology.*, v. 25, p.197-210, 2015. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu103>

PINEDA, M., CORVO, L., CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F., et al. *Trypanosoma cruzi* cleaves galectin-3 N-terminal domain to suppress its innate microbicidal activity. *Clin Exp Immunol.*, v. 199, p.216-229, 2020. <https://doi.org/10.1111/cei.13379>

POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. *Wien Med Wochenschr.*, v.162, p.187-190, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10354-012-0071-6>

RABINOVICH, G.A., TOSCANO, M.A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol.*, v. 9, p.338-52. 2009. <https://doi.org/10.1038/nri2536>

RAMOS, A. J.; CANTERO, M.R.; ZHANG, P., et al. Morphological and electrical properties of human trophoblastchoriocarcinoma, BeWo cells. *Placenta*, v.29, p-492-502, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.02.013>

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J.P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect Genet Evol.*, v. 12, p.359-68, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.010>

RIBEIRO, M., FRANCO, P.S., LOPES-MARIA, J.B., et al. Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. *Exp Parasitol.*, v. 181, p. 111-118, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.08.004>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*, v.25, p. 264-96, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

RYAN CM, MEHLERT A, RICHARDSON JM, et al.. Chemical structure of *Trichomonas vaginalis* surface lipoglycan: a role for short galactose (beta1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. *J Biol Chem.*, v. 286, p.40494-508, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280578>

SAEIJ, J.P.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*, v. 10, p. 476-481, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.001>

SALOMÃO, C. L.; SILVA, N. M.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; SU, C.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) da cidade de Uberlândia , MG. 30f. Monografia (no formato de artigo científico) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

SANMARCO, L.M., PONCE, N.E., VISCONTI, L.M., et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, v. 4, p.857-869, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006>

SASAI, M., YAMAMOTO, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Mol Med.*, v. 51, p.1-10, 2019. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0353-9>

SATO, S., ST-PIERRE, C., BHAUMIK, P., NIEMINEN, J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunol Rev.*, v. 230, p.172-87, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00790.x>

SATO, S., BHAUMIK, P., ST-PIERRE, G., PELLETIER, I. Role of galectin-3 in the initial control of *Leishmania* infection. *Crit Rev Immunol.*, v.34, p.147-175, 2014. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2014010154>

SCIACCHITANO, S., LAVRA, L., MORGANTE, A., et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci.*, v. 19, p. 379, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms19020379>

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.*, v. 233, p. 6425-6440, 2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>

SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol.*, v.75, p. 341-350, 2016. <https://doi.org/10.1111/aji.12466>

SHI, Z.R.; TAN, G.Z.; MENG, Z.; et al. Association of anti-acidic ribosomal protein P0 and anti-galectin 3 antibodies with the development of skin lesions in systemic lupus

erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, v.67, p.193-203, 2015.
<https://doi.org/10.1002/art.38891>

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, v. 364, p. 2749-61, 2009. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>

SILVA, R.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Research.*, v. 105, p. 893-8, 2009.
<https://doi.org/10.1007/s00436-009-1526-6>

SILVA, A.A., TEIXEIRA, T.L., TEIXEIRA, S.C., et al. Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. *Front Cell Infect Microbiol.*, v.7, p.463, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00463>

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica*, v. 20, p. 131-43, 2010.

SOUZA, B.S.F., SILVA, K.N., SILVA, D.N., et al. Galectin-3 Knockdown Impairs Survival, Migration, and Immunomodulatory Actions of Mesenchymal Stromal Cells in a Mouse Model of Chagas Disease Cardiomyopathy. *Stem Cells Int.*, v. 2017, p. 3282656, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3282656>

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P., et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.109, p.5844-9, 2012.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

SUAREZ, C., LENTINI, G., RAMASWAMY, R., et al. A lipid-binding protein mediates rhoptry discharge and invasion in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* parasites. *Nat Commun.*, v. 10, p. 4041, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11979-z>

TAHARA, M.; ANDRABI, S.B.; MATSUBARA, R.; et al. A host cell membrane microdomain is a critical factor for organelle discharge by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int.*, v.65, p.378-388, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.012>

TEO, C. F.; ZHOU, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51; p. 679-88, 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.01059-06>

THAN, N.G., ROMERO, R., BALOGH, A., et al. Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia. *J Pathol Transl Med.*, v.49, p. 181-208, 2015.
<https://doi.org/10.4132/jptm.2015.02.25>

THOMAS, L., PASQUINI, L.A. Galectin-3 Exerts a Pro-differentiating and Pro-myelinating Effect Within a Temporal Window Spanning Precursors and Pre-oligodendrocytes: Insights into the Mechanisms of Action. *Mol Neurobiol.*, v.57, p. 976-987, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01787-3>

VAN DEN BERG, T.K., Honing, H., Franke, N., et al. LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J Immunol.*, v.173, p.1902-1907, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1902>

Verma, P., Laforce-Nesbitt, S.S., Tucker, et al. Galectin-3 expression and effect of supplementation in neonatal mice with disseminated *Candida albicans* infection. *Pediatr Res.*, v.85, p. 527-532, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0279-x>

XIAO, J.; YOLKEN, R.H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf.)*, v.213, p.828-845, 2015. <https://doi.org/10.1111/apha.12458>

XIAO, Q., ZENG, F.L., TANG, G.Y, et al. Expression of galectin-3 and apoptosis in placental villi from patients with missed abortion during early pregnancy. *Exp Ther Med.*, v.17, p.2623-2631, 2019. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7227>

YANG, H.; TAYLOR, H.S.; LEI, C.; CHENG, C.; ZHANG, W. Hormonal regulation of galectin 3 in trophoblasts and its effects on endometrium. *Reprod Sci.*, v.18, p.1118-1127, 2011. <https://doi.org/10.1177/1933719111407212>

YANG, H., LEI, C.X., ZHANG, W. Human chorionic gonadotropin (hCG) regulation of galectin-3 expression in endometrial epithelial cells and endometrial stromal cells. *Acta Histochem.*, v.115, p.3-7, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.05.002>

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol.*, v.14, p.109-121, 2014. <https://doi.org/10.1038/nri3598>

YU, S.; JIA, L.; ZHANG, Y.; et al. IL-12 induced the generation of IL-21- and IFN- γ -co-expressing poly-functional CD4⁺ T cells from human naive CD4⁺ T cells. *Cell Cycle*, v.14, p.3362-3372, 2015. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093703>

WU, Z.M.; YANG, H.; LI, M.; et al. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. *Placenta*, v.33, p.188-194, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.12.007>

ZHANG, Y., LAI, B.S., JUHAS, M., ZHANG, Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. *Microbiol Res.*, v. 227, p.126293, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.06.003>

ZHOU, W., QUAN, J.H., LEE, Y.H., et al. *Toxoplasma gondii* Proliferation Require Down-Regulation of Host Nox4 Expression via Activation of PI3 Kinase/Akt Signaling

Pathway. PLoS One., v.8, p. e66306, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066306>

ZHU, W., LI, J., PAPPOE, F., SHEN, J., YU, L. Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. Front Microbiol., v. 10, p. 899, 2019.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00899>

Legendas

Figura 1. Expressão de Gal-3 em células BeWo submetidas ou não à técnica de shRNAi. A expressão foi verificada por *Western Blotting* (A) e por Imunofluorescência (B - C). (A) Células (1×10^6 /1000 μ L) foram cultivadas em placas de 6 poços e mantidas por 24 h em meio RPMI 10%. Em seguida, as células foram lisadas e 150 μ g de proteína foram separadas por SDS-PAGE. Posteriormente, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de PVDF e posterior detecção da Gal-3 com anticorpo monoclonal anti-Gal-3. *Western Blotting*. A expressão de β -actina foi utilizada como controle. (B - C) Células (3×10^4 /200 μ L) foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro em meio RPMI 10%. Após 24 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído e incubadas com anticorpo monoclonal anti-Gal-3, seguido de incubação com IgG anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488. (B) Células BeWo Gal-3; (C) Células BeWo Gal-3 KD. *Gal-3 foi marcada pelo fluorocromo verde e o núcleo foi marcado usando-se To-PRO3 (azul).

Figura 2. Proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD. Células (3×10^4 /200 μ L) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI 10% por 24 h. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 5 parasitos por célula (5:1) em meio RPMI 2%. Após 24 h, as células foram lisadas e o número de taquizoítas de *T. gondii* foi quantificado por meio da reação colorimétrica da β -galactosidase. Foram realizados três experimentos em nonoplicata. Os dados estão expressos como média \pm SEM e são representativos de três experimentos independentes realizados em nonoplicatas. * Comparação entre a proliferação de *T. gondii* em células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD (teste *t* de Student, $P < 0,05$)

Figura 3. Porcentagem de adesão e taxa de invasão de *T. gondii* em células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD. Células (3×10^4 /200 μ L) foram cultivadas em placas, de 24 poços sobre lamínulas para avaliar a adesão ou em placas de 96 poços para avaliar a taxa de invasão por 24 h em meio RPMI 10%. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 5 parasitos por célula (5:1) e mantidas a 5% de CO₂ e 37°C por 3 h. A porcentagem de adesão dos parasitos às células BeWo foi determinada por meio de ensaio de imunofluorescência e contagem dos parasitos aderidos às células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD (A). As imagens de fluorescência representam o parasito marcado com fluorocromo verde, os filamentos de actina marcados com fluorocromo vermelho e o

núcleo em azul nas células BeWo Gal-3 (C) e BeWo Gal-3 KD (D). A taxa de invasão (taquizoítos intracelulares) foi determinada por meio da reação da β -galactosidase. Os dados estão expressos como média \pm SEM. *Comparação entre as células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD (teste *t* de Student, $P < 0,05$).

Figura 4. Produção de citocinas por células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD infectadas ou não com *T. gondii*. Células (3×10^4 /200 μ L) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI 10% por 24 h. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 5 parasitos por célula (5:1). Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a dosagem de IFN- γ (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D) por ELISA. Os dados estão expressos como média \pm SEM. As comparações entre os grupos foram realizadas pelos testes Kruskal-Wallis ou One-Way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, quando apropriado. \dashv Comparações entre BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD infectadas ou não ($P < 0,05$). * Comparações entre BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 *T. gondii* ou entre BeWo Gal-3 KD e BeWo Gal-3 KD *T. gondii* ($P < 0,05$).

Figura 5. Produção de ROS em células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 KD infectadas ou não por *T. gondii*. Células (1×10^6 /1000 μ L) foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 h em meio RPMI 10%. Em seguida, as células foram infectadas com *T. gondii* na proporção de 5 parasitos por célula (5:1). Após 24 h, as células foram incubadas com 2 μ M 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'dichlorodihydrofluoresceína diacetato acetyl ester (CM-H2DCFDA) e a produção de ROS foi quantificada por citometria de fluxo, com contagem mínima de 10.000 eventos por amostra. A produção de ROS está representada como porcentagem da população celular expressando ROS (A). Os histogramas representam a porcentagem de células que produzem ROS (B). Os dados estão expressos como média \pm SEM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \dashv Comparação entre células BeWo Gal-3 e BeWo Gal-3 + *T. gondii* ou entre BeWo Gal-3 KD e BeWo Gal-3 KD + *T. gondii* ($P < 0,05$).

Figura 6. Desenho esquemático representando o papel de Gal-3 em células BeWo infectadas com *T. gondii*. Células BeWo Gal-3 (A), quando comparadas às células BeWo Gal-3 KD (B), apresentaram apresentaram taxas de adesão, invasão e proliferação intracelular do parasito diminuídas e aumento da produção das citocinas IFN- γ , IL-8, IL-10 e IL-6.

Figuras

A

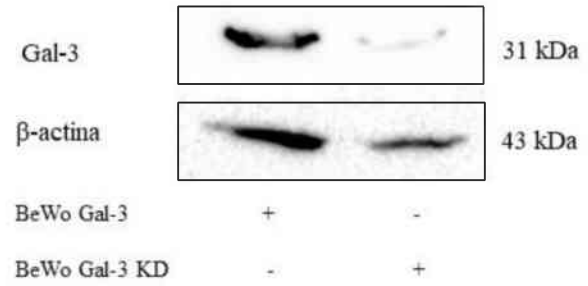
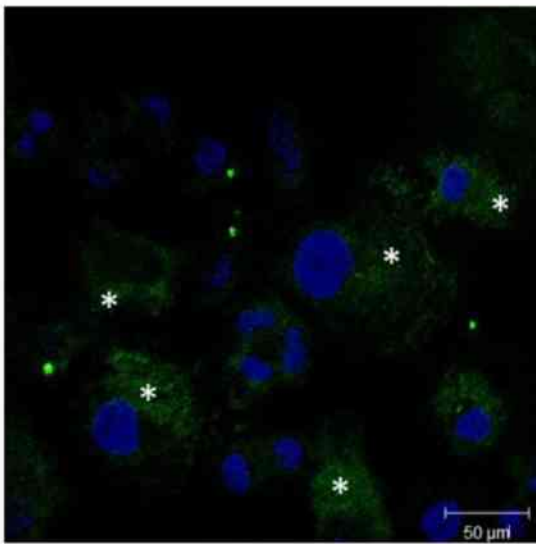


Figura 1

B



C

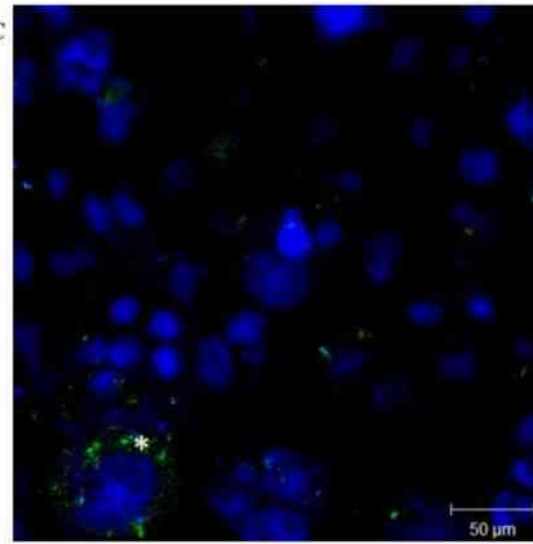


Figura 2

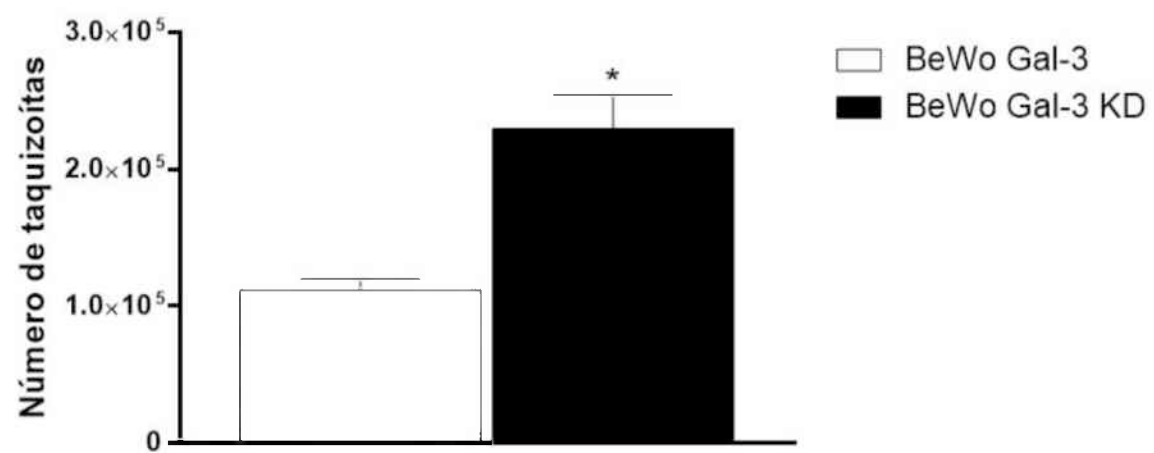


Figura 3

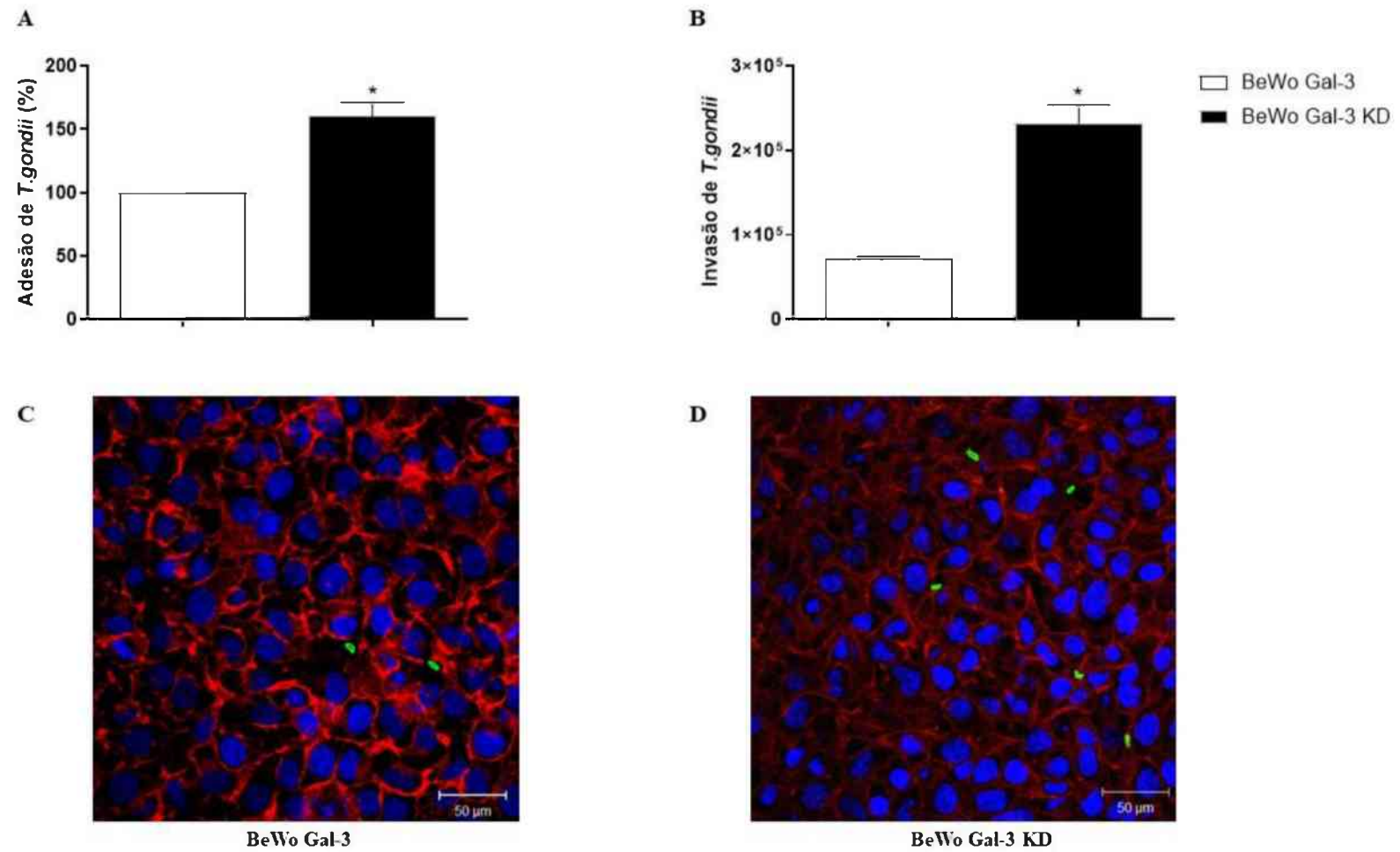


Figura 4

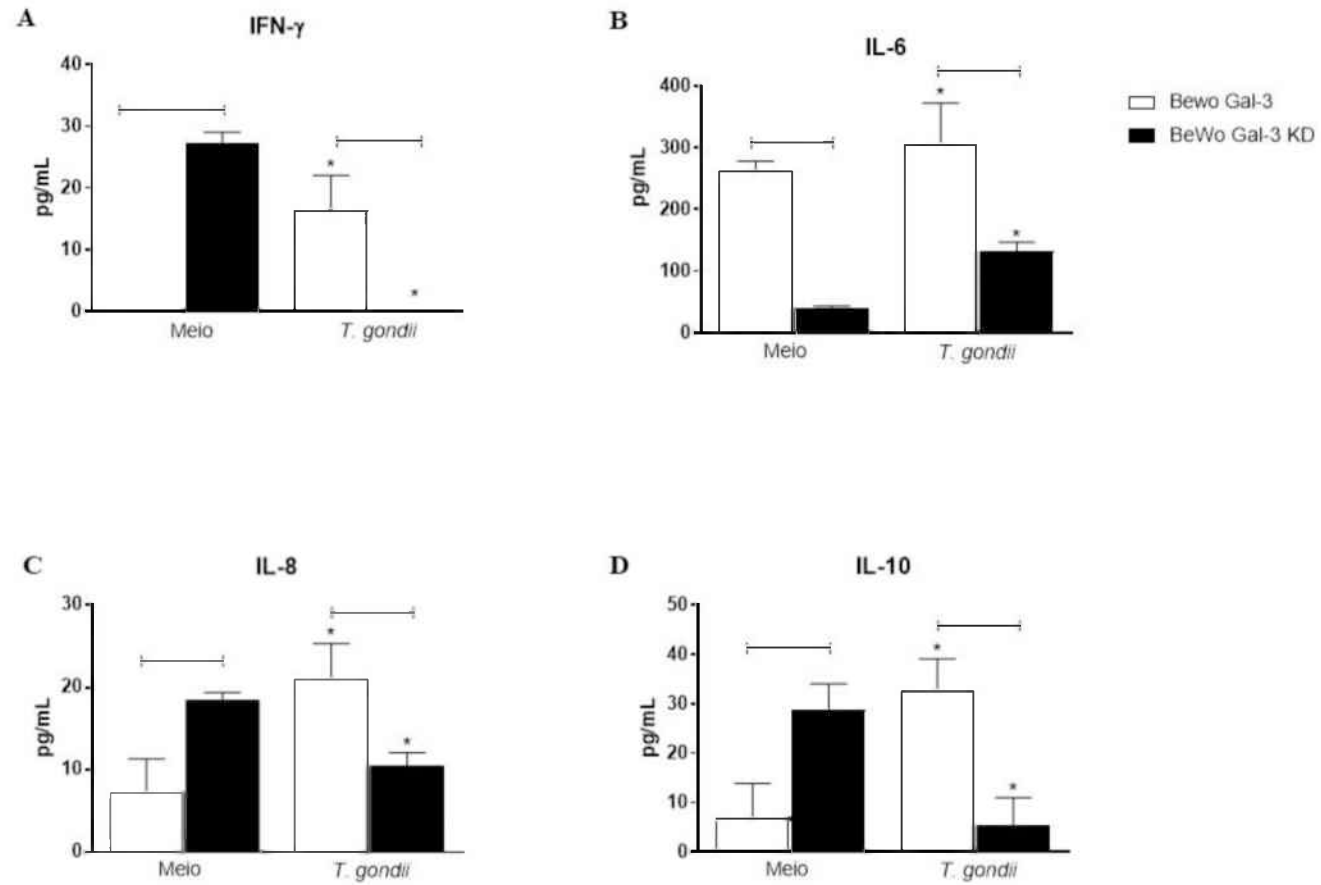


Figura 5

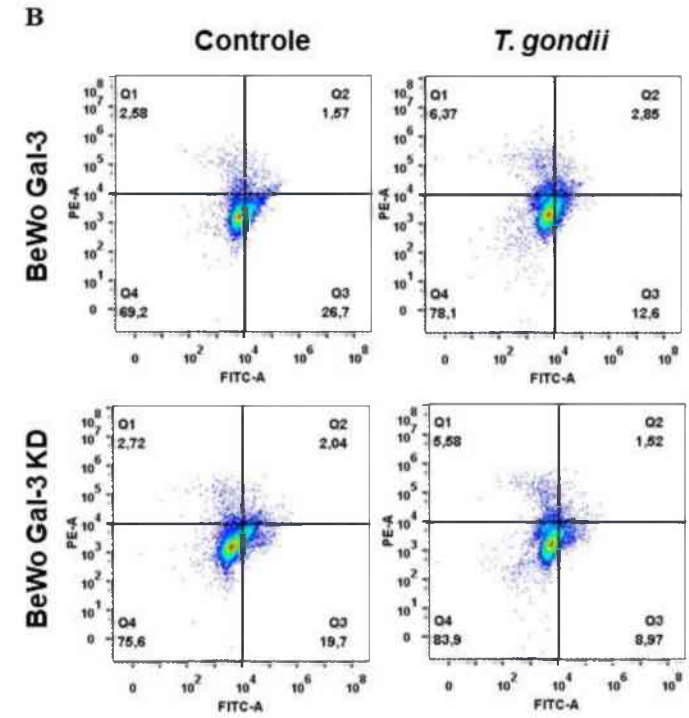
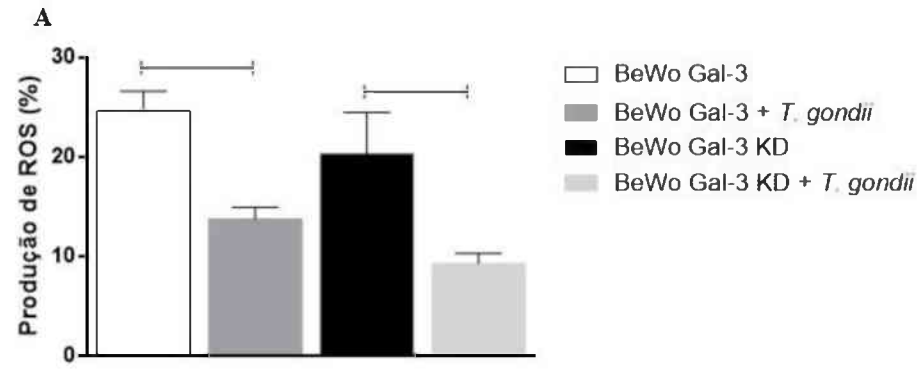


Figura 6

