

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICBIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

GALECTINA-3 DESEMPENHA UM PAPEL PROTETIVO NA INFECÇÃO POR
Leishmania (Leishmania) amazonensis

Rafael Martins de Oliveira

Uberlândia – MG
Abril – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICBIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**GALECTINA-3 DESEMPENHA UM PAPEL PROTETIVO NA INFECÇÃO POR
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre.

Rafael Martins de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva
Coorientadora: Thaise Lara Teixeira

Uberlândia – MG
Abril – 2021

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

O48 2021	<p>Oliveira, Rafael Martins de, 1996- Galectina-3 desempenha um papel protetivo na infecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis [recurso eletrônico] : Galectina-3 auxilia na resposta contra Leishmania (Leishmania) amazonensis / Rafael Martins de Oliveira. - 2021.</p> <p>Orientador: Claudio Vieira da Silva. Coorientadora: Thaise Lara Teixeira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.188 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972-, (Orient.). II. Teixeira, Thaise Lara, 1987-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p>CDU: 612.017</p>
-------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado número 269 do PPIPA				
Data:	trinta de abril de 2021	Hora de início:	08h30min	Hora de encerramento:	11h 40min
Matrícula do Discente:	11912IPA006				
Nome do Discente:	Rafael Martins de Oliveira				
Título do Trabalho:	<i>Galectina-3</i> desempenha um papel protetivo na infecção por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	<i>Galectina-3</i> desempenha um papel protetivo na infecção por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>				

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: Samuel Cota Teixeira - ICBIM/UFU; Daiana Silva Lopes - ICS / UFB; Claudio Vieira da Silva - ICBIM/UFU - (Presidente) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Claudio Vieira da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente, o tempo de arguição e de 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 Mestre.

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 **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/04/2021, às 11:49, 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 **Samuel Cota Teixeira, Usuário Externo**, em 30/04/2021, às 11:52, 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 **Daiana Silva Lopes, Usuário Externo**, em 30/04/2021, às 11:52, 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 **2731805** e o código CRC **E30E9A75**.

Dedicatória

*Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais,
e à minha namorada Natalia Carine.*

**“E tudo o que precisamos é
apenas um pouco de paciência”
(Guns N’ Roses)**

Agradecimentos

Não há outra maneira de começar meus agradecimentos que não seja exaltando meus pais: Lucimar e Paulo Roberto, que sempre fizeram todo o possível para que eu tivesse a melhor educação. Com seus esforços e dedicação exemplares, hoje sou Biotecnologista e prestes a obter meu mestrado.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor Claudio, que me deu a primeira oportunidade em um laboratório e me recebeu da melhor forma possível no LATRI quando eu estava no quarto período da graduação. Desde então, sempre contei com seu apoio para evoluir e concretizar minhas conquistas na vida acadêmica.

Agradeço aos meus companheiros de pesquisa, em especial ao Cassiano, que sempre esteve presente no laboratório quando precisei de ajuda, e à Bruna pelo auxílio em todas as citometrias. Agradeço também à minha coorientadora Thaise, que a todo momento se mostrou muito presente, e que, com seus ensinamentos, conselhos e puxões de orelha, contribuiu muito para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha namorada Natalia, com quem estou junto há 5 anos, e desde o início deste mestrado convive comigo diariamente. Agradeço pelo carinho, pelos inúmeros momentos de alegria, pela companhia no dia a dia e pela paciência. Sem você, esta caminhada jamais teria sido a mesma.

Por fim, agradeço às agências financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido para a execução deste trabalho.

Lista de abreviaturas

BHI - Brain Heart Infusion

CD4⁺ – cluster of differentiation 4

CD8⁺ - cluster of differentiation 8

cDNA – DNA complementar

CR1 – complemento receptor 1

CR 3 – complemento receptor 3

CRD – domínio de reconhecimento de carboidratos

DAMP – padrão molecular associado ao dano

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DP - desvio padrão

FITC - fluorescein isothiocyanate

Gal-3 - galectina-3

HE - hematoxilina-eosina

IFN- γ - interferon-gama

IL-1b – interleucina 1 beta

IL-4 – interleucina 4

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

KO – knockout

L. (L.) amazonensis – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

L. major – *Leishmania major*

MHC II – complexo principal de histocompatibilidade classe II

mRNA – RNA mensageiro

NO – óxido nítrico

PAMP – padrão molecular associado ao patógeno

PBS – tampão fosfato-salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PGN - PBS + 0.25% gelatin + 0.1% sodium azide

PI – iodeto de propídeo

PRR – receptor de reconhecimento de padrões

RNA - ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

shRNA - short hairpin RNA

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

Th₁ – T-helper 1

Th₂ – T-helper 2

TNF – fator de necrose tumoral

TRITC - tetramethylrhodamine

VP - vacúolo parasitóforo

WT - wild type

Zym – Zymosan

Lista de figuras

Figura 1. Esquema representativo das formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	16
Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	17
Figura 3. Esquema representativo da estrutura da Galectina-3.....	21
Figura 4. Esquema representativo do projeto experimental <i>in vivo</i>	28
Figura 5. A infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> aumenta a expressão de gal-3 em células peritoneais de camundongos C57BL/6.....	31
Figura 6. A falta de gal-3 aumenta a invasão e replicação de <i>L. (L.) amazonensis</i> em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	33
Figura 7. A ausência de gal-3 favorece a formação de vacúolos gigantes em macrófagos peritoneais infectados por <i>L. (L.) amazonensis in vitro</i>	34
Figura 8. Recrutamento de leucócitos durante a infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i>	35
Figura 9. Efeitos da ausência de gal-3 na infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos C57BL/6 <i>in vivo</i>	37
Figura 10. Análise histológica.....	40
Figura 11. A falta de gal-3 aumenta a morte celular em células peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i>	42

Lista de tabelas

Tabela 1. Análise qualitativa de infiltrados celulares nos tecidos das patas de camundongos (WT e gal-3 KO) infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i>	38
Tabela 2. Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos do baço de camundongos (WT e gal-3KO) infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i>	39
Tabela 3. Análise qualitativa do infiltrado de células nos tecidos do linfonodo popliteal de camundongos (WT e gal-3KO) infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i>	39

Sumário

Lista de abreviaturas.....	6
Lista de figuras	9
Lista de tabelas	10
Resumo	13
Abstract	14
1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Leishmanioses</i>	15
1.2 <i>Galectina-3</i>	19
2.0 OBJETIVOS	24
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	24
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	24
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 <i>Animais e Ética</i>	24
3.2 <i>Parasitos</i>	25
3.3 <i>Análise da expressão de gal-3 em células peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados ou não por Leishmania (L.) amazonensis</i>	25
3.4 <i>Ensaio de imunofluorescência</i>	26
3.5 <i>Ensaio de invasão e replicação de L. (L.) amazonensis em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO</i>	26
3.6 <i>Análise da formação de VPs</i>	27
3.7 <i>Ensaio de recrutamento de leucócitos após 4 e 96 horas de infecção por L. (L.) amazonensis em camundongos C57BL / 6 WT e gal-3 KO</i>	27
3.8 <i>Ensaio in vivo</i>	28
3.9 <i>PCR quantitativo</i>	29
3.10 <i>Análise Histológica</i>	29
3.11 <i>Análise de morte celular em leucócitos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e KO infectados por L. (L.) amazonensis</i>	30
3.12 <i>Análise estatística</i>	30
4.0 RESULTADOS	31
4.1 <i>A infecção por L. (L.) amazonensis aumenta a expressão de gal-3 em células peritoneais de camundongos C57BL/6</i>	31
4.2 <i>A falta de gal-3 aumenta a invasão e replicação de L. (L.) amazonensis em macrófagos in vitro.</i>	32
4.3 <i>A ausência de gal-3 favorece a formação de vacúolos gigantes em macrófagos peritoneais infectados por L. (L.) amazonensis in vitro</i>	33

<i>4.4 Gal-3 modula o recrutamento de leucócitos durante a infecção por L. (L.) amazonensis.....</i>	<i>35</i>
<i>4.5 A ausência de gal-3 leva ao aumento da carga parasitária nas patas e linfonodos de camundongos gal-3 KO in vivo</i>	<i>36</i>
<i>4.6 A ausência de gal-3 leva a uma resposta inflamatória mais intensa nos tecidos de camundongos gal-3 KO in vivo.....</i>	<i>38</i>
<i>4.7 A ausência de gal-3 aumenta a morte celular em leucócitos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados por L. (L.) amazonensis</i>	<i>41</i>
5.0 DISCUSSÃO	43
6.0 CONCLUSÃO.....	46
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8.0 Anexo 1	58

Resumo

Leishmania (L.) amazonensis é uma das espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea na América do Sul. Após infectar o hospedeiro vertebrado, *L. (L.) amazonensis* invade principalmente neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Essas células apresentam altos níveis de expressão de galectina-3. Estudos mostram que gal-3 pode atuar como receptor de reconhecimento de padrões (PRR) e padrão molecular associado a patógenos (PAMP), desempenhando uma série de funções em infecções por diversos microrganismos. No entanto, o papel dessa proteína no contexto da infecção por *L. (L.) amazonensis* é desconhecido. Aqui demonstramos, por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, a importância da gal-3 na infecção pelo parasito. Nossos dados mostraram que em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 galectina-3 *knockout* (gal-3 KO) infectados com *L. (L.) amazonensis*, houve um maior número de células infectadas e de parasitos intracelulares, quando comparados às células WT. Vimos também que na ausência de gal-3, houve maior formação de vacúolos parasitóforos, bem como maior presença de apoptose e necrose nas células peritoneais de camundongos infectados. Além disso, observamos, *in vivo*, que 8 semanas após a infecção por *L. (L.) amazonensis*, as patas de camundongos gal-3 KO apresentaram maior carga parasitária e inflamação em comparação com WT. Desta forma, obtivemos evidências experimentais de que gal-3 desempenha um papel protetor no curso da infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Palavras-chave: Galectina-3, *Leishmania (L.) amazonensis*, recrutamento de leucócitos, replicação intracelular, vacúolo parasitóforo

Abstract

Leishmania (L.) amazonensis is one of the species responsible for cutaneous leishmaniasis in South America. After entering the vertebrate host, *L. (L.) amazonensis* invades mainly neutrophils, macrophages and dendritic cells. These cells have high levels of galectin-3 expression. Studies show that gal-3 can act as pattern recognition receptor (PRR) and pathogen-associated molecular pattern (PAMP), performing a series of functions in several microorganisms infections. However, the role of this protein in the context of *L. (L.) amazonensis* infection is unknown. Here we demonstrate, through in vitro and in vivo assays, the importance of gal-3 in parasite infection. Our data showed that in peritoneal macrophages of *L. (L.) amazonensis* infected C57BL/6 galectin-3 knockout (gal-3 KO) mice, there was a higher number of infected cells and parasites, when compared to WT cells. We also saw that in the absence of gal-3, there was a higher formation of parasitophorous vacuoles, as well as a higher apoptosis and necrosis presence in peritoneal cells of infected mice. In addition, we observed, in vivo, that 8 weeks after *L. (L.) amazonensis* infection in the footpads, gal-3 KO mice showed higher parasite load and inflammation compared to WT. In this way, we obtained experimental evidence that gal-3 plays an important role in the course of the *L. (L.) amazonensis* infection.

Keywords: Galectin-3; *Leishmania (L.) amazonensis*; leukocyte recruitment; intracellular replication; parasitophore vacuole

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmanioses*

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, sendo transmitidas ao ser humano através da picada de fêmeas de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Dados epidemiológicos sugerem que mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e que mais de 1 milhão de novos casos são relatados anualmente, com 20 000 a 30 000 mortes atribuídas à doença. Em 2017, mais de 90% dos novos casos reportados à Organização Mundial da Saúde, ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (SUBRAMANIAN, 2018; MACHADO et al., 2019; WHO, 2020).

Em humanos, as leishmanioses se manifestam em 4 formas clínicas principais: visceral, cutânea localizada, cutânea difusa e mucocutânea (MACHADO et al., 2019). A leishmaniose visceral, também conhecida como kala-azar, apresenta sintomas que incluem perda de peso, episódios irregulares de febre, inchaço do fígado e baço e anemia. A forma cutânea localizada é caracterizada pela formação de lesões ulceradas na derme. As lesões podem ser únicas ou múltiplas e apresentam borda em moldura. Na forma cutânea difusa, há a presença de lesões não-ulceradas, que se espalham por toda a pele. Na leishmaniose mucocutânea, a lesão se inicia da mesma forma que na leishmaniose cutânea localizada, no entanto, após algum tempo, surgem lesões destrutivas que atacam a cartilagem e mucosas. As regiões mais comumente afetadas são a boca, faringe, nariz e laringe, provocando deformação no rosto das pessoas afetadas (HANDLER et al., 2015; ARONSON e JOYA, 2019; WHO, 2020). *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma das espécies responsáveis pelo desenvolvimento da leishmaniose na América do Sul. Largamente distribuída no Brasil, *L. (L.) amazonensis* pode levar ao desenvolvimento de duas formas da doença: leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose cutânea difusa (MARLOW et al., 2013).

Há várias décadas, o tratamento de primeira linha é baseado na administração parenteral de antimoniais pentavalentes. Atualmente esses fármacos estão disponíveis em duas formulações diferentes: o Glucantime e o Pentosam, com apenas o Glucantime sendo disponível no Brasil (GOTO, 2010; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; DE VRIES et al., 2015). Em casos onde as drogas de primeira linha não são eficazes, drogas como a Anfotericina e a Miltefosina são empregadas como segunda escolha (DE MORAIS et al., 2015). Ainda não

existe um consenso sobre uma droga para o tratamento das leishmanioses cutâneas. Os tratamentos disponíveis apresentam problemas como: alta toxicidade, efeitos colaterais e não são eficazes contra todas as espécies de *Leishmania*. Além disso, as taxas de cura entre as mesmas espécies diferem geograficamente, fazendo com que a medicação precise ser individualizada para cada paciente (ARONSON e JOYA, 2019). Devido às dificuldades e complexidades do tratamento, esta doença continua sendo um importante problema de saúde global, com o número de casos crescendo em alguns países (KEVRIC et al., 2015).

Leishmania apresenta duas formas evolutivas principais: promastigota e amastigota (**Figura 1**), e seu ciclo de vida é heteroxênico, envolvendo insetos vetores e hospedeiros vertebrados, como por exemplo o ser humano e os cães. A infecção do inseto ocorre quando flebotomíneos fêmeas picam um hospedeiro infectado e ingerem células contendo amastigotas do parasito. Na porção anterior do trato digestório do inseto, em uma matriz rica em nutrientes, os amastigotas são transformados em promastigotas procíclicos. Após a ruptura da matriz, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestivo e se replicam ali.

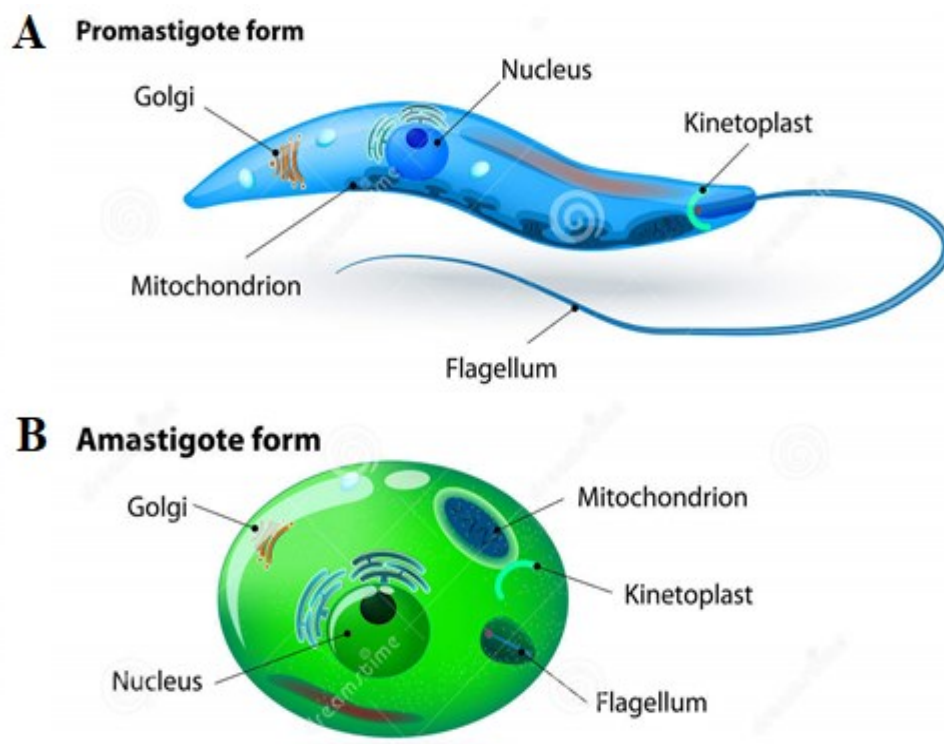


Figura 1. Esquema representativo das formas evolutivas de *Leishmania*. A. Promastigota; B. Amastigota. Figura adaptada de: Dreamstime. <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-leishmania-changes-cell-shape-life-cycle-amastigote-promastigote-leptomonad-form-age54254041>. Acesso em 11 de maio de 2021.

Em seguida, vão para a região anterior do intestino, onde sofrem o processo de metaciclogênese, durante o qual o tamanho do corpo diminui, e o tamanho e o batimento dos flagelos aumentam, fazendo com que, os agora chamados promastigotas metacíclicos, sejam altamente infecciosos (**Figura 2**). Posteriormente, as formas metacíclicas migram para a probóscide e são transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, fechando, assim, o ciclo de vida (VANNIER-SANTOS et al., 2002; BURCHMORE et al., 2003; MISHRA et al., 2009).

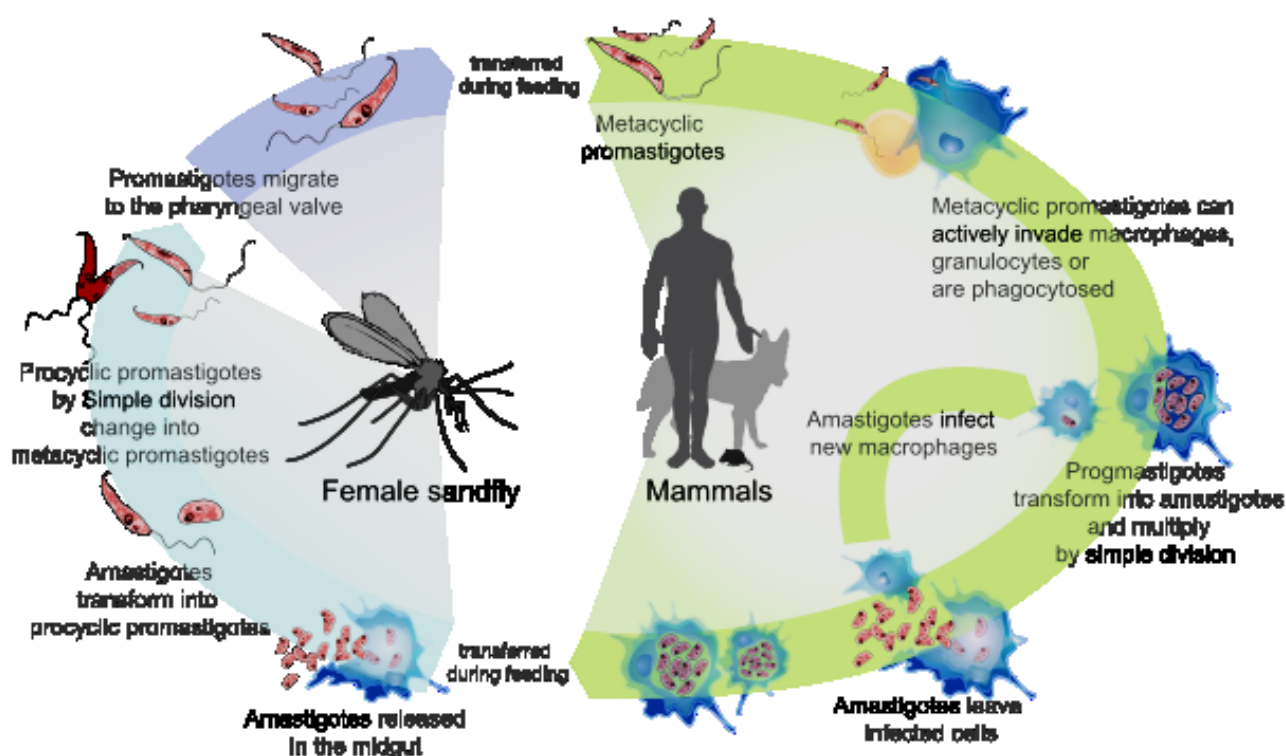


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida de *Leishmania*. Fonte: Wikimedia Commons https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg Acesso em: 11 de maio de 2021.

No hospedeiro vertebrado, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, são consideradas as principais células hospedeiras durante o processo de infecção de *L. (L) amazonensis*. Esta relação entre patógeno e células do hospedeiro é o foco de vários estudos visando o entendimento do processo de estabelecimento das leishmanioses. A adesão do parasito na célula hospedeira ocorre principalmente pelo flagelo ou corpo celular, e seu reconhecimento envolve moléculas presentes na sua superfície, como lipofosfoglicano e a glicoproteína 63, que se ligam a diferentes receptores expressos na superfície das células do sistema imune (CUNNINGHAM, 2002). Dentre os principais receptores dos macrófagos envolvidos na adesão e no reconhecimento de *Leishmania*, estão os receptores do sistema

complemento (CR1 e CR3), receptores de manose e receptores de fibronectina (SILVA-ALMEIDA et al., 2010; UENO e WILSON, 2012).

Após a forma promastigota entrar e aderir às células do hospedeiro vertebrado, esses parasitos são fagocitados e diferenciados em amastigotas (STUART et al., 2008). Após o processo de fagocitose, *Leishmania* spp. é localizada em compartimentos chamados fagossomos, que passam por um processo de maturação, que envolve fusão com vesículas endossomais e lisossomos, levando à formação dos vacúolos parasitóforos (VP), onde os parasitos se diferenciam e se multiplicam (ANTOINE et al., 1990; REAL e MORTARA, 2012). A composição do VP pode mudar, dependendo da espécie de *Leishmania* e das células do hospedeiro envolvidas. Para sobreviver, *Leishmania* spp. desenvolveu estratégias que visam combater o poder microbicida desse ambiente (PODINOVSKAIA; DESCOTTEAX, 2015). As formas promastigotas de certas espécies de *Leishmania* usam um mecanismo para evadir a resposta imune do hospedeiro por meio da inibição da biogênese do fagolisossomo (DESJARDINS e DESCOTTEAUX, 1997). Especificamente, *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de fundir vacúolos individuais para formar um vacúolo maior, diluindo assim, as proteases presentes no lisossomo e transformando o parasito na forma amastigota, resistente às enzimas (CANTON et al., 2012; REAL e MORTARA, 2012). A maioria das espécies do gênero *Leishmania* reside dentro de vacúolos estreitos e individuais, porém amastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzem vacúolos maiores que podem conter de 20 a 30 amastigotas (DESJARDINS et al., 1994; ANTOINE et al., 2004; NDJAMEN et al., 2010). A biogênese do vacúolo contendo *L. (L.) amazonensis* envolve a aquisição de marcadores de membrana de endossomos tardios da célula do hospedeiro, como LAMPs, Rab, catepsina, ATPases, e moléculas de MHC classe II (REAL e MORTARA, 2012).

Leishmania spp. possui a capacidade de evadir a imunidade inata do hospedeiro, havendo um crescente aumento de parasitos durante as semanas iniciais de infecção, antes do desenvolvimento da imunidade adquirida. A imunidade adquirida é baseada nas células T CD4⁺ e CD8⁺. A liberação de citocinas pró-inflamatórias de perfil T-helper 1 (Th₁), tais como interferon-gama (IFN-γ), interleucina 12 (IL-12), e fator de necrose tumoral (TNF-α), leva à ativação de potentes atividades leishmanicidas, como indução da síntese de óxido nítrico (NO), pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e uma explosão oxidativa em células infectadas do hospedeiro e, conseqüentemente, levando a um decréscimo na parasitemia. Por outro lado, a indução de Th₂, com a produção de citocinas como a IL-10, pode levar à susceptibilidade do indivíduo e ao desenvolvimento da doença. Esta resposta imune permite ao

protozoário persistir em diversos tecidos até mesmo após o término do tratamento clínico (KAYE e SCOTT, 2011; MOREIRA et al., 2018).

Buscando entender melhor os mecanismos imunológicos das infecções por *Leishmania* spp. em humanos, modelos murinos experimentais de diferentes linhagens têm sido utilizados, uma vez que estes são capazes de mimetizar a infecção humana. Camundongos da linhagem BALB/c são mais suscetíveis à infecção, e quando infectados com *Leishmania* spp., apresentam doença progressiva e potencialmente visceralizante (SCOTT e SCHARTON, 1994; FONSECA et al., 2003). Em contraste, camundongos da linhagem C57BL/6 são capazes de controlar a infecção (FONSECA et al., 2003). De forma semelhante a resposta imune humana, o perfil de resistência da linhagem C57BL/6 está relacionado à resposta do tipo Th₁, que envolve citocinas e ativação das células inflamatórias (XU et al., 1998; WEI et al., 1999), enquanto que o padrão de susceptibilidade dos camundongos BALB/c é decorrente da resposta do tipo Th₂, (SYPEK e WYLER, 1991; HEINZEL et al., 1993).

1.2 Galectina-3

As lectinas são proteínas encontradas em muitos organismos, como: microrganismos, plantas e animais. Elas têm a capacidade de se ligar reversivelmente a açúcares sem qualquer modificação química (LAKHTIN et al., 2011; ZENG et al., 2012). São amplamente utilizadas na natureza para realizar tarefas importantes, que estão relacionadas ao reconhecimento e interação celular, síntese e transporte de proteínas, regulação da divisão celular, fotossíntese, imunidade inata e outros processos relacionados (DE SCHUTTER E VAN DAMME, 2015; FEIZI e HALTIWANGER, 2015).

No início do século XX, uma classificação dividia as lectinas de acordo com sua reatividade aos monossacarídeos, da seguinte forma: ligação à manose, ligação à galactose, ligação à quitina e outras lectinas. Porém, esta classificação desconsiderava as características estruturais destas proteínas, e com o avanço da ciência, tornou-se possível identificar melhor as cadeias de polipeptídeos presentes nas moléculas. Então, outra classificação foi adotada com base na similaridade de sequências de aminoácidos dessas proteínas e na estrutura de seus domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD). Cada CRD é caracterizado por uma única sequência de aminoácidos, uma dobra típica do polipeptídeo e uma estrutura de ligação (VAN DAMME et al., 2014).

A especificidade das lectinas não é determinada apenas pelo CRD, uma vez que diferentes CRDs podem interagir com estruturas de carboidratos semelhantes (VAN DAMME et al., 2008). A ligação carboidrato-lectina depende de muitos fatores, como: a estrutura dos locais de ligação, seu arranjo espacial e a valência da lectina. A especificidade da interação é baseada na presença de certos resíduos de carboidratos em moléculas de glicano. As lectinas podem interagir com monossacarídeos, oligossacarídeos e com resíduos de carboidratos presentes em moléculas como polissacarídeos, glicoproteínas e glicolípídeos (LEBED et al., 2006; GABIUS et al., 2011). Além disso, elas são específicas de certas estruturas de sacarídeos. Sendo assim, algumas lectinas podem interagir somente com resíduos de manose ou de glicose, por exemplo (KOBAYASHI et al., 2014).

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

Algumas dessas proteínas são amplamente distribuídas em diferentes tipos de células e tecidos, enquanto outras são expressas de forma mais seletiva. Embora todas as galectinas se liguem à galactose, elas são específicas para diferentes oligossacarídeos (LIU et al., 2002; RABINOVICH et al., 2007; YANG et al., 2008). Membros da família das galectinas podem ser secretados por vias secretoras que ainda não foram definidas e detectados no espaço extracelular. Essas proteínas estão localizadas no citoplasma e podem mover-se para o núcleo ou estar associadas a vesículas intracelulares (LIU et al., 2002).

As galectinas desempenham uma variedade de funções, incluindo a mediação de interações célula-célula e sinalização transmembranar (TAYLOR e DRICKAMER, 2011). As tarefas de várias galectinas foram demonstradas em várias células do sistema imunológico. Essas funções foram descobertas pela transfecção de células com cDNAs que codificam galectinas; tratando células com pequenos RNAs de interferência silenciador (siRNA); e até

mesmo usando células de camundongos *knockouts* (KOs), tendo assim, as situações de superexpressão ou expressão suprimida da galectina (LIU e RABINOVICH, 2010). Estudos têm demonstrado que as galectinas podem desempenhar papéis dentro da célula e podem atuar independentemente da ligação com carboidratos. Em particular, gal-3 se liga a uma série de proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelular (LIU et al., 2002).

O LGALS3 é o gene que codifica a gal-3 em humanos. Este abrange 17Kb e possui 6 éxons e 5 íntrons, e é formado por 750 pares de bases, que traduzem uma proteína de 250 aminoácidos (RAZ et al., 1991; YUKO et al., 1991; KADROFSKE et al., 1998). Possuindo uma estrutura única entre as galectinas, gal-3 tem sua porção C-terminal (onde está seu CRD) dobrada na forma de um sanduíche β , com um núcleo de triptofano e um sítio de ligação de carboidratos não canônico, que medeia interações com açúcares (AGRWAL et al., 1993; MILLER et al., 2016). Na outra extremidade da proteína, está a região N-terminal de cerca de 120 resíduos (**Figura 3**). Este resíduo contém uma extensão N-terminal com dois locais de fosforilação potenciais (resíduos 6 e 12), seguido por uma região que contém várias repetições em tandem de segmentos de aminoácidos curtos (Prolina-Glicina-Alanina-Tirosina). No domínio rico em glicina e prolina, gal-3 oligomeriza com outras moléculas de gal-3 ou estabelece uma interação com outras proteínas (WANG et al., 2014; IPPEL et al., 2016; MILLER et al., 2016).

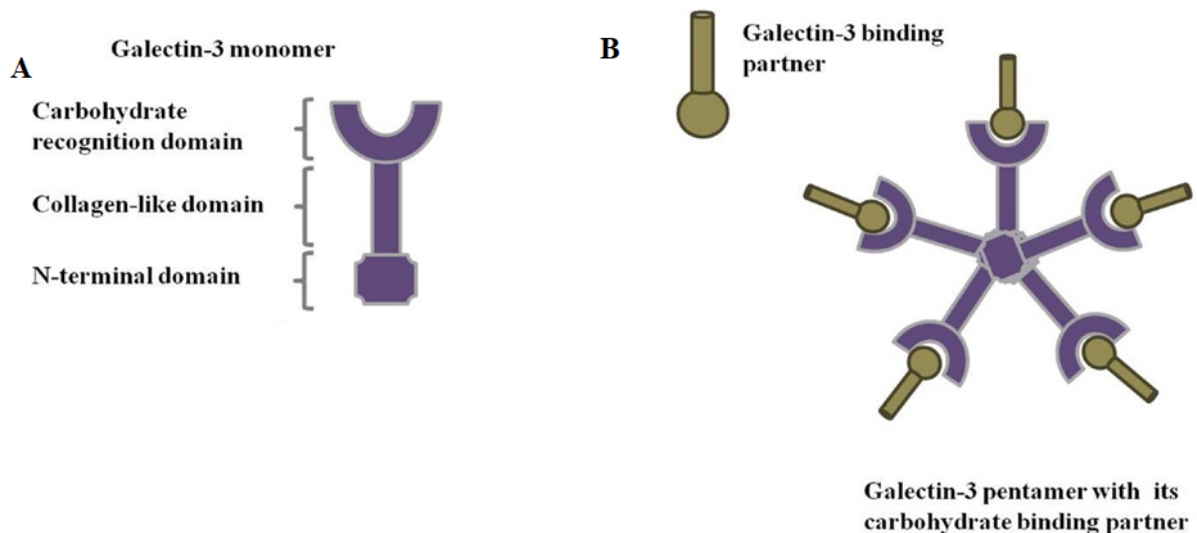


Figura 3. Esquema representativo da estrutura da Galectina-3. A. Monômero de Gal-3; B. Oligomerização de gal-3 através de seu domínio N-terminal com um parceiro ligante (FORTUNA-COSTA et al., 2014).

Gal-3 é amplamente distribuída por todo o corpo humano e pode ser encontrada em uma variedade de tecidos, tais como: pulmão, sangue, rim, coração, trato digestivo e trato geniturinário. É altamente expressa em células mieloides, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, bem como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (NISHI et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2014; CHEN et al., 2016; YAN et al., 2016; SACCON et al., 2017). A nível celular, gal-3 pode estar localizada no citoplasma, núcleo e membranas. Além disso, também pode ser encontrada fora da célula por meio de diferentes estímulos após a liberação (FRITSCH et al., 2016; KANG et al., 2016). Várias funções foram atribuídas à gal-3 dentro da célula, como por exemplo: atividade antiapoptótica, regulação do splicing do mRNA, regulação da via de sinalização de FcεRI nos mastócitos e modulação da ativação de RhoA e MLCK durante invasão celular em carcinoma hepatocelular (DAGHER et al., 1995; HAUDEK et al., 2010; SERIZAWA et al., 2015; BAMBOUSKOVA et al., 2016).

Depois que a gal-3 é sintetizada, ela é armazenada no citoplasma, onde desempenha certas funções, incluindo aquelas que requerem acesso ao núcleo. Por exemplo, quando um estímulo, como uma infecção, é realizado, a proteína é liberada passivamente das células que estão morrendo ou é ativamente secretada por células ativadas. No ambiente extracelular, gal-3 também executa uma variedade de tarefas, incluindo imunidade inata contra patógenos e as inflamações aguda e crônica. Estudos recentes têm mostrado que a gal-3 pode ser usada como um receptor de reconhecimento de padrões (PRR) para reconhecer bactérias, vírus, fungos e protozoários, e por isso, tem a capacidade de reconhecer estruturas microbianas (padrões moleculares associados aos patógenos - PAMPs), que possuem propriedades pró-inflamatórias e podem promover a infiltração de neutrófilos e outras células do sistema imunológico no local da infecção. Outros estudos mostraram que a gal-3 também pode ser liberada como um padrão molecular associado ao dano (DAMP) (VASTA, 2009, 2012; SATO et al., 2009, 2014; CHEN et al., 2014).

Evidências do papel da gal-3 como DAMP foram vistas em um estudo de sepse causada por infecção por *Frasciscella* spp. em camundongos. De acordo com os dados, gal-3 pode ser liberada para os pulmões de camundongos infectados com infecção letal por *F. novicida*, e pode induzir: a infiltração de leucócitos (principalmente neutrófilos), liberação de citocinas inflamatórias e dano vascular (MISHRA et al., 2013). Além de aumentar a migração de neutrófilos para os tecidos inflamados, gal-3 também participa da remoção dos mesmos e desempenha um papel importante na interrupção da resposta inflamatória (KARLSSON et al., 2009).

Em outro estudo, foi descoberto que a infecção oral por *Toxoplasma gondii* em camundongos pode levar a uma alta expressão de gal-3 em leucócitos que infiltram o intestino, pulmão, fígado e cérebro. Em comparação com os camundongos WT, os camundongos gal-3 KO infectados, mostraram redução da inflamação no intestino, no fígado e no cérebro e apresentaram uma carga maior de parasitos no cérebro. Em contraste, as células dendríticas de camundongos gal-3 KO produziram mais IL-12, possivelmente tentando neutralizar a diminuição no recrutamento de células inflamatórias. Neste estudo, a atividade pró-inflamatória pode ser mediada por gal-3 extracelular, enquanto gal-3 intracelular atua regulando a secreção de citocinas em células dendríticas, afetando assim, a resposta imune adaptativa (BERNARDES et al., 2006).

Nosso grupo de pesquisa, estudou previamente, a atividade biológica da gal-3 nas fases aguda e crônica da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* (parasito pertencente à mesma família que *Leishmania* spp.). Camundongos C57/BL6 WT e gal-3 KO foram infectados intraperitonealmente, com o intuito de avaliar a parasitemia, recrutamento de células inflamatórias e produção de citocinas no baço e coração. Os resultados mostraram que a falta de gal-3 aumentou a parasitemia e reduziu o recrutamento de leucócitos. Em amostras de coração, observou-se aumento da secreção de TNF- α e IFN- γ nos animais WT, enquanto que nos animais gal-3 KO, houve aumento da produção de IL1 β e IL-4 durante a fase aguda. Observou-se também que, na fase crônica da infecção, o tecido cardíaco dos camundongos WT apresentou resposta imune com perfil Th₂, com níveis basais de TNF- α e IFN- γ , diminuição da concentração de IL-1 β e aumento de IL-4. Esses dados indicam que gal-3 possui funções de quimiotaxia e de imunoregulação, essenciais para o controle da fase aguda da infecção e redução do comprometimento cardíaco na fase crônica (DA SILVA et al., 2017).

Diversos estudos envolvendo *L. major* (espécie causadora da Leishmaniose cutânea no Velho Mundo), demonstraram que a Gal-3 atua como PRR, reconhecendo moléculas como a Gal β 1-3 na superfície do parasito (SATO, 2014); e como DAMP, facilitando a infiltração de neutrófilos nos sítios de infecção (BHAUMIK, 2013). No entanto, se tratando de *L. (L) amazonensis* (espécie causadora da forma cutânea na América do Sul), não existem muitas informações a respeito. Diante da clara importância da gal-3 nas infecções patogênicas e da escassez de informações relacionada ao gênero *Leishmania*, somado às evidências de seu papel importante ao longo da infecção por *T. cruzi*, buscamos estudar o papel da proteína gal-3 no curso da infecção por *L. (L) amazonensis*.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da proteína galectina-3 no curso da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão da proteína gal-3 na infecção por *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar o processo de invasão e multiplicação do parasito em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO *in vitro*;
- Avaliar a formação de vacúolos parasitóforos em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 Gal-3 KO e WT infectados por *L. (L.) amazonensis in vitro*;
- Caracterizar e quantificar o recrutamento de leucócitos peritoneais em camundongos WT e gal-3 KO na invasão e replicação por *L. (L.) amazonensis in vitro*;
- Avaliar o crescimento da lesão nas patas de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO, infectados por *L. (L.) amazonensis*, ao longo de 8 semanas *in vivo*;
- Determinar a carga parasitária das patas e linfonodos de animais C57BL/6 WT e gal-3 KO após 8 semanas de infecção *in vivo*;
- Analisar o score inflamatório em tecidos de animais WT e gal-3 KO após 8 semanas de infecção com *L. (L.) amazonensis in vivo*;
- Analisar morte celular em células peritoneais WT e gal-3 KO infectadas por *L. (L.) amazonensis in vitro*.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Ética

Foram utilizados camundongos (fêmeas) das linhagens BALB/c e C57BL/6 (WT e gal-3 KO), com 6 semanas de idade, os quais foram manipulados e eutanasiados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em condição padrão de 12

horas de luz e 12 horas de escuro, em temperatura controlada (25° C), com alimento e água *ad libitum*. Para a execução dos experimentos envolvendo a utilização destes animais, um projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA (Protocolo Número: 075/18) (Anexo 1).

3.2 Parasitos

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) com passagens controladas, foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion - HiMedia (BHI) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 mg de gentamicina/mL e L-glutamina 2mM (Gibco BRL, Life Technologies, New York, EUA), a 26 ° C.

Para a manutenção da virulência da cepa, 10⁷ promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária foram inoculados com seringa de insulina 1 ml (bico slip com Agulha 13 x 3,8 – BD), na região palmar da pata, diluídos em cerca de 40 ul de tampão fosfato salina (PBS). Após 8 semanas, os animais foram devidamente eutanasiados e as patas retiradas para purificação dos amastigotas. As mesmas foram imersas em álcool 70% por 5 minutos e depois lavadas com 1 mL de meio de cultura DMEM. Em seguida as patas foram colocadas em placas Petri estéreis e cuidadosamente tiveram sua pele retirada para a raspagem da lesão com bisturi. Após esse processo, o lavado obtido foi transferido para tubo pistilo para rompimento das células, e depois para um tubo falcon de 15 ml. Posteriormente foram realizadas sucessivas centrifugações diferenciais, sendo que na última, o Pellet foi resuspenso em PBS estéril e passado por 6 vezes em seringa de insulina para dissociar os parasitos. Por fim, os amastigotas obtidos foram contados na câmara de Neubauer e mantidos em garrafas de cultura em meio BHI.

3.3 Análise da expressão de gal-3 em células peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados ou não por *Leishmania (L.) amazonensis*

Para a análise da expressão da gal-3, camundongos C57BL/6 WT foram divididos em 2 grupos: o grupo infectado, com 2x10⁷ promastigotas de *L. (L.) amazonensis* inoculados via intraperitoneal, e o grupo não infectado, que teve 1 ml de meio tioglicolato a 3% (Difco TM Fluid Thioglycolate Medium - BD) inoculado no peritônio, para recrutamento de células inflamatórias. Após 96 horas, os camundongos foram eutanasiados e as células peritoneais

coletadas com 5 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - HiMedia gelado, que foi inserido na cavidade peritoneal e recuperado após 1 minuto. As células obtidas foram fixadas em formaldeído a 4% (Milliore) por 3 horas e, em seguida, lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X e incubadas em solução de PGN (PBS + gelatina 0,25% + azida de sódio 0,1%) por 3 horas. Para a marcação das células, foi preparada uma solução com o anticorpo M3/38 (anti-gal3 feito em rato) (sc-19283) na proporção de 1:1 diluído em PGN + saponina 0,1%. As células foram incubadas em *shaker* à temperatura ambiente, durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com solução de anticorpo secundário (anti-rato) conjugado com fluorocromo FITC (Invitrogen A11034) na proporção de 1:200 diluído em PGN + saponina 0,1%, por 1 hora. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo (CytoFLEX - Beckman Coulter). Os resultados da citometria foram analisados pelo software Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter).

3.4 Ensaio de imunofluorescência

Para a realização do ensaio de imunofluorescência, foram utilizados camundongos C57BL/6 WT. Os macrófagos peritoneais destes animais foram coletados usando 1 ml de meio tioglicolato a 3% inoculado via intraperitoneal, como descrito acima. As células obtidas foram, então, plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm (2×10^5 células/poço) e incubadas *overnight* para adesão. No dia seguinte, 2×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram adicionados a cada poço. Células não infectadas foram utilizadas como controle. Após 4 horas, as células foram fixadas em formaldeído a 4% durante 1 hora e lavadas três vezes com PBS. Em seguida, foram permeabilizadas e bloqueadas com PGN + saponina 0,1%, e marcados com anticorpo primário M3/38 (anti-gal3 feito em rato) durante a noite. Em seguida, o anticorpo secundário (anti-rato) conjugado com fluorocromo FITC foi adicionado. As células também foram marcadas com DAPI (1:500) para a coloração de ácidos nucleicos. As imagens foram obtidas em um microscópio confocal Zeiss LSM 510 META com aumento de 63 x.

3.5 Ensaios de invasão e replicação de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO

Para a realização dos ensaios de invasão e replicação de *L. (L.) amazonensis*, foram utilizados camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO. Os macrófagos peritoneais destes animais foram obtidos e plaqueados em placas de 24 poços (2×10^5 células/poço), como descrito acima. No dia seguinte, 2×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram adicionados a cada poço para ensaios de invasão. Para os ensaios de replicação, 1×10^6 promastigotas foram adicionados a cada poço. Após 4 (invasão) e 96 (replicação) horas, as lamínulas foram fixadas em solução de Bouin e as células coradas em Giemsa. Posteriormente, com o uso da microscopia de luz, foi possível quantificar o número de células infectadas e parasitos em 100 células para os ensaios de invasão; e o número de parasitos em 100 células infectadas nos ensaios de replicação.

3.6 Análise da formação de VPs

Para análise da formação dos VPs, foi realizado um ensaio de replicação, no qual macrófagos peritoneais de camundongos WT e gal-3 KO foram plaqueados e infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, da mesma forma mencionada anteriormente. Células WT e gal-3 KO não infectadas foram usadas como controles. Além disso, partículas de zymosan (10 partículas/célula) foram usadas como controle da capacidade fagocitária dos macrófagos. Para a avaliação da quantidade e tamanho dos vacúolos, um microscópio de luz com câmera acoplada (Nikon) foi utilizado para obter 40 imagens por replicata, sendo 6 replicatas. A quantificação do número de vacúolos, bem como de sua área, foi realizada por meio do software Image J1.48.

3.7 Ensaios de recrutamento de leucócitos após 4 e 96 horas de infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL / 6 WT e gal-3 KO

Para a realização dos ensaios de recrutamento de leucócitos, camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO foram usados. A infecção dos animais foi realizada via intraperitoneal, utilizando as formas promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* (2×10^7 parasitos/animal). Após a inoculação dos parasitos, os camundongos foram eutanasiados nos tempos de 4 e 96 horas. Os macrófagos peritoneais foram coletados como descrito acima. As células foram centrifugadas a 1700 rpm por 290 segundos em uma centrífuga citológica Fanem modelo 248 e coradas com Giemsa em aparelho corador de lâminas automático SlideInk. Para a avaliação dos leucócitos, foi utilizado microscópio de luz (Nikon) com câmera acoplada para

obtenção de 40 imagens por replicata, sendo 6 replicatas. A avaliação diferencial dos leucócitos foi realizada por meio da análise de 300 células totais/replicata, as quais foram classificadas em: macrófagos, neutrófilos e linfócitos.

3.8 Ensaio *in vivo*

Foram utilizados 10 camundongos C57BL/6, com idade de 6 semanas, sendo 5 WT e 5 gal-3 KO. Foram inoculados 40 μ l, contendo 1×10^7 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* diluídos em PBS 1x estéril, em cada uma das patas posteriores de cada camundongo. Após a inoculação dos parasitos, os animais foram acompanhados por 8 semanas, tendo as patas medidas uma vez por semana, através de um paquímetro digital (ZAAS-PAQ-DIGITAL). A partir das medidas de altura e largura obtidas, calculamos a área da pata direita de cada animal, sendo: Área = Largura x Altura (**Figura 4**).

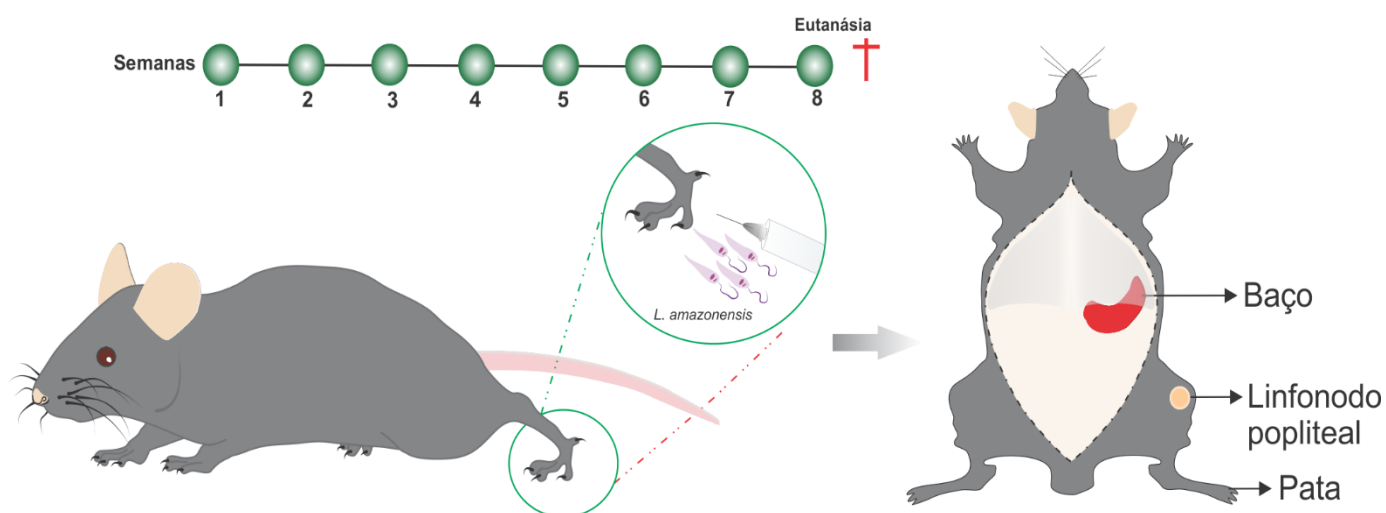


Figura 4. Esquema representativo do projeto experimental *in vivo*. Dez camundongos C57BL/6, com 6 semanas de idade, 5 WT e 5 gal-3 KO, foram inoculados com 40 μ l, contendo 1×10^7 promastigotas de *L. (L.) amazonenses* diluídos em PBS 1X estéril, em cada uma das patas posteriores. Após a inoculação dos parasitos, os animais foram acompanhados durante 8 semanas, sendo as patas posteriores medidas uma vez por semana, por meio de um paquímetro digital. No final da oitava semana, os camundongos foram eutanasiados e coletados os seguintes órgãos: patas posteriores, baços e linfonodos poplíteais para análises posteriores. Este ensaio foi realizado três vezes, independentemente.

Oito semanas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e tiveram alguns órgãos coletados para análises. Foram coletadas: as patas direita e esquerda posteriores, baço e linfonodos do poplíteo. As patas foram fotografadas com câmera de celular, com escala definida, objetivando demonstrar se há a diferença no tamanho do órgão ao longo da infecção entre os grupos WT e gal-3 KO. Linfonodos, baços e patas de cada um dos animais foram armazenados em solução de formaldeído 4% para confecção de lâminas histológicas. Já os

linfonodos do poplíteo esquerdo e a pata esquerda foram utilizados para quantificar a carga parasitária por PCR quantitativo.

3.9 PCR quantitativo

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

As reações de PCR foram preparadas utilizando os oligonucleotídeos: 13A (5'-GGGGTGGAGTCTGGGCGT-3') e 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'), os quais resultam na amplificação de fragmento de DNA do cinetoplasto (120 bp) de *Leishmania* sp. como descrito por Rodgers, Popper e Wirth, 1990. Para quantificação da carga parasitária, foi feita uma curva padrão com diluições seriadas de DNA obtido de 1×10^8 parasitos de *L. (L.) amazonensis*. A eficiência das curvas foi testada, o slope ficou entre 110 e 90% e o valor de R^2 sempre maior ou igual a 0,99.

Para reação de qPCR, 50ng de amostras de DNA, quelante de DNA Power SYBR Green PCR Master Mix reagente (Applied Biosystems) e 10µM de cada primer foram utilizados. As reações foram processadas em aparelho termociclador ABI7300 (Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem foram como segue: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos. Após a elongação final do qPCR, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 para 95°C, com aumento gradual de 0,5 °C/segundo para obter a temperatura de melting e evitar produtos inespecíficos.

3.10 Análise histológica

Linfonodos do poplíteo, baços e patas recolhidas dos animais foram processados para análise histológica. Foram fixados em formaldeído 4% (em PBS), posteriormente desidratados em álcoois de crescentes concentrações, diafanizados em xilol e finalmente incluídos em parafina. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura e colocados em lâminas de vidro.

Subsequentemente, tais cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise da quantidade de células inflamatórias presentes nos tecidos entre os diferentes grupos (WT e gal-3 KO). Para analisar a quantidade de células inflamatórias, foi estabelecido o critério dos autores Santos Lima and Minorprio, 1996.

A avaliação da resposta tecidual foi baseada em observações qualitativas e semiquantitativas de fenômenos relacionados à inflamação celular e tecidual encontrados nos órgãos avaliados dos animais WT e gal-3 KO. O tipo e a gravidade do infiltrado inflamatório foram determinados por dois observadores independentes que foram calibrados quanto à presença ou ausência de (i) resposta inflamatória, (ii) neutrófilos, (iii) macrófagos, (iv) linfócitos, (v) plasmócitos, (vi) células gigantes tipo corpo estranho, (vii) tecido necrótico (viii) edema (viii) fibroblastos/fibrose e (ix) adipócitos. Ademais, foi anotada a presença de (x) megacariócitos, (xi) de centros germinativos e (xii) de corpúsculos apoptóticos apenas nas amostras de baço e/ou linfonodos. Essas características foram pontuadas quanto à intensidade: (-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa.

3.11 Análise de morte celular em leucócitos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e KO infectados por *L. (L.) amazonensis*

Camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO foram infectados, via intraperitoneal, com 2×10^7 promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Após 96 horas, os animais foram eutanasiados e as células peritoneais recolhidas, como descrito anteriormente. As células obtidas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X gelado. Como controle de apoptose, células foram aquecidas durante 10 minutos à 70°C em banho seco. Para o controle de necrose, células foram tratadas com formaldeído 4% durante 15 minutos. Para a marcação de apoptose e necrose, as amostras foram incubadas em solução de binding buffer 1X + anexina V + PI por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a marcação, as células foram separadas em 6 replicatas/grupo e analisadas por citometria de fluxo (citômetro CytoFLEX - Beckman Coulter). Os resultados da citometria foram analisados pelo software Kaluza Analysis 2.1.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes, em triplicata. A comparação de dados

entre os grupos foi analisada pelo teste t ou equivalente não paramétrico e, two way-ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.0 RESULTADOS

4.1 A infecção por *L. (L.) amazonensis* aumenta a expressão de gal-3 em células peritoneais de camundongos C57BL/6

Primeiramente, objetivamos verificar se a expressão de gal-3 é modulada ao longo da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Para isso, infectamos, via intraperitoneal, camundongos C57BL/6 WT com formas promastigotas do parasito por 96 horas e recuperamos o lavado peritoneal, a fim de realizar citometria de fluxo para analisar a expressão da proteína nas células infectadas, em comparação com células não infectadas. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão de gal-3 nas células infectadas pelo parasito, em relação ao controle não infectado (**Figura 5A**).

Além disso, realizamos um ensaio de imunofluorescência, para comparar a localização de gal-3 em células não infectadas ou infectadas por *L. (L.) amazonensis*. Os resultados mostraram que, no grupo não infectado, a proteína é distribuída por toda a célula. No grupo

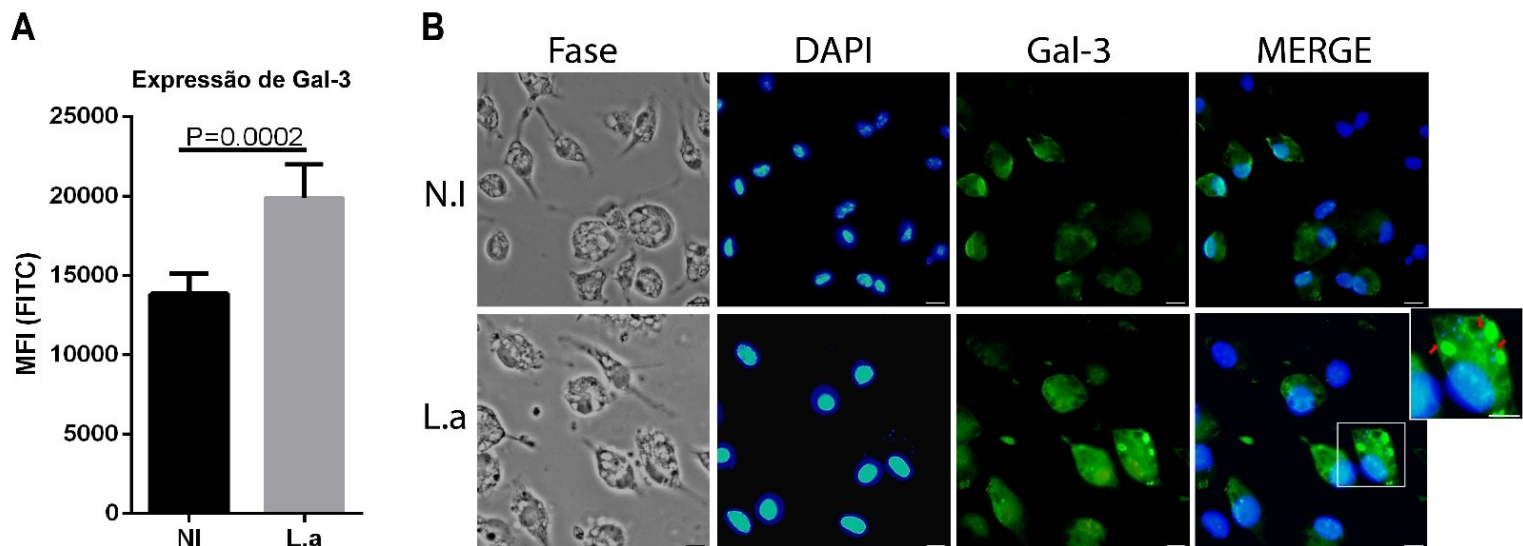


Figura 5. A infecção por *L. (L.) amazonensis* aumenta a expressão de gal-3 em células peritoneais de camundongos C57BL/6. Camundongos C57BL/6 WT foram divididos em 2 grupos: o grupo infectado com *L. (L.) amazonensis* e o grupo não infectado. As células foram fixadas e marcadas com anticorpos para citometria de fluxo e ensaio de imunofluorescência. **(A).** Intensidade de fluorescência mediana (MFI) comparando a expressão de gal-3 em células peritoneais. **(B).** Microscopia confocal. Azul: DAPI para marcação do núcleo das células, Verde: Gal-3 marcada com anticorpo anti-gal-3 primário e secundário conjugado com fluorocromo FITC, (barras de escala = 20 μ m). N.I = Não infectado, L.a = *L. (L.) amazonensis*. As setas destacam a co-localização do parasito e gal-3. Os dados representam a média \pm DP. Os ensaios foram realizados três vezes, de forma independente. As comparações entre WT e gal-3 KO foram realizadas com o teste Mann-Whitney bicaudal (GraphPad prism 6.01.).

infectado, gal-3 parece estar concentrada próxima aos parasitos que invadiram as células (**Figura 5B**). Motivados por esses resultados, buscamos investigar melhor o papel de gal-3 na infecção por *L. (L.) amazonensis*, por meio de experimentos envolvendo células gal-3 KO.

4.2 A falta de gal-3 aumenta a invasão e replicação de L. (L.) amazonensis em macrófagos in vitro.

Para investigar o papel da gal-3 na invasão e replicação do parasito nas células, realizamos ensaios com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos peritoneais de camundongos WT e gal-3 KO. Os dados mostraram um aumento na carga parasitária (parasitos/célula infectada) nas células gal-3 KO, em comparação com WT, no tempo de 4 horas (**Figura 6A, B**). Da mesma forma, a falta da proteína favoreceu a replicação intracelular, uma vez que o número de parasitos nessas células (gal-3 KO) foi maior do que nas células WT no tempo de 96 horas (**Figura 6C, D**). Esses resultados são a primeira evidência do envolvimento da gal-3 no curso da infecção por *L. (L.) amazonensis*.

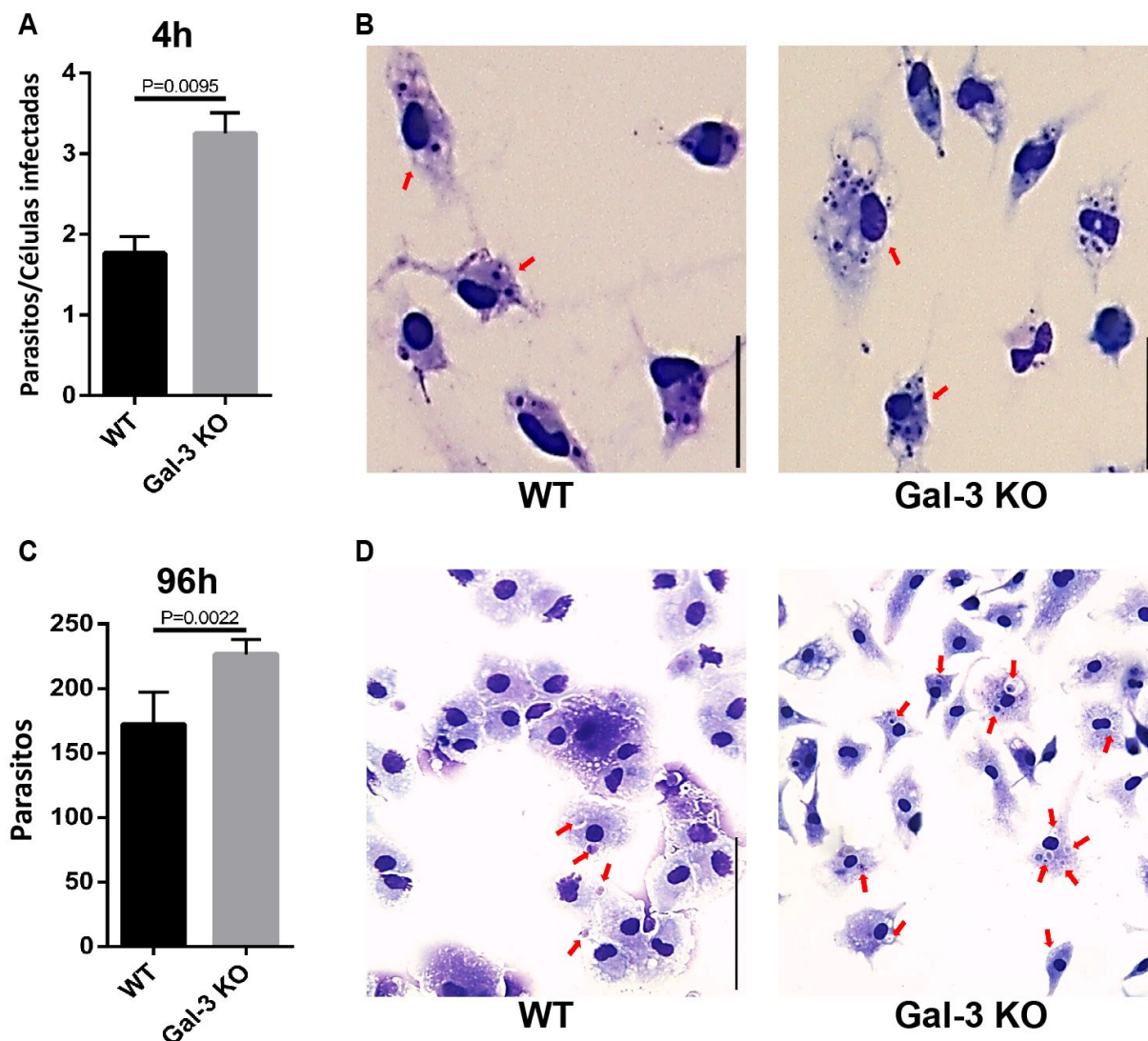


Figura 6. A falta de gal-3 aumenta a invasão e replicação de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais *in vitro*. Ensaios de invasão e replicação foram realizados utilizando macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. As células foram fixadas e coradas em Giemsa. **(A)**, Razão entre o número de parasitos e células infectadas após 4 horas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. **(B)**, Imagens representativas de macrófagos peritoneais WT e gal-3 KO após 4 horas de invasão (barras de escala = 20 μ m). As setas indicam parasitos que invadiram as células **(C)**, Número de parasitos em 100 células infectadas após 96 horas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. **(D)**, Imagens representativas de macrófagos peritoneais WT e gal-3 KO após 96 horas de replicação (barras de escala = 50 μ m). As setas indicam os parasitos que invadiram as células. Os dados representam a média \pm DP. Os ensaios foram realizados três vezes, de forma independente. As comparações entre WT e gal-3 KO foram realizadas com o teste de Mann-Whitney bicaudal (GraphPad prism 6.01.).

4.3 A ausência de gal-3 favorece a formação de vacúolos gigantes em macrófagos peritoneais infectados por *L. (L.) amazonensis* *in vitro*

Visando entender o mecanismo pelo qual *L. (L.) amazonensis* se replicou melhor nos macrófagos gal-3 KO, decidimos quantificar o número de VPs nos grupos WT e gal-3 KO. Observamos que após 96 horas de infecção, o grupo gal-3 KO apresentou VPs em maior número e com maior área comparado ao grupo WT (**Figura 7A, B**). Além disso, para demonstrar que a modulação do tamanho do VP ocorre na presença de *L. (L.) amazonensis*, utilizamos um controle com zymosan. As células com partículas de zymosan internalizadas não aumentaram a área dos VPs na ausência de gal-3 (**Figura 7C, D**).

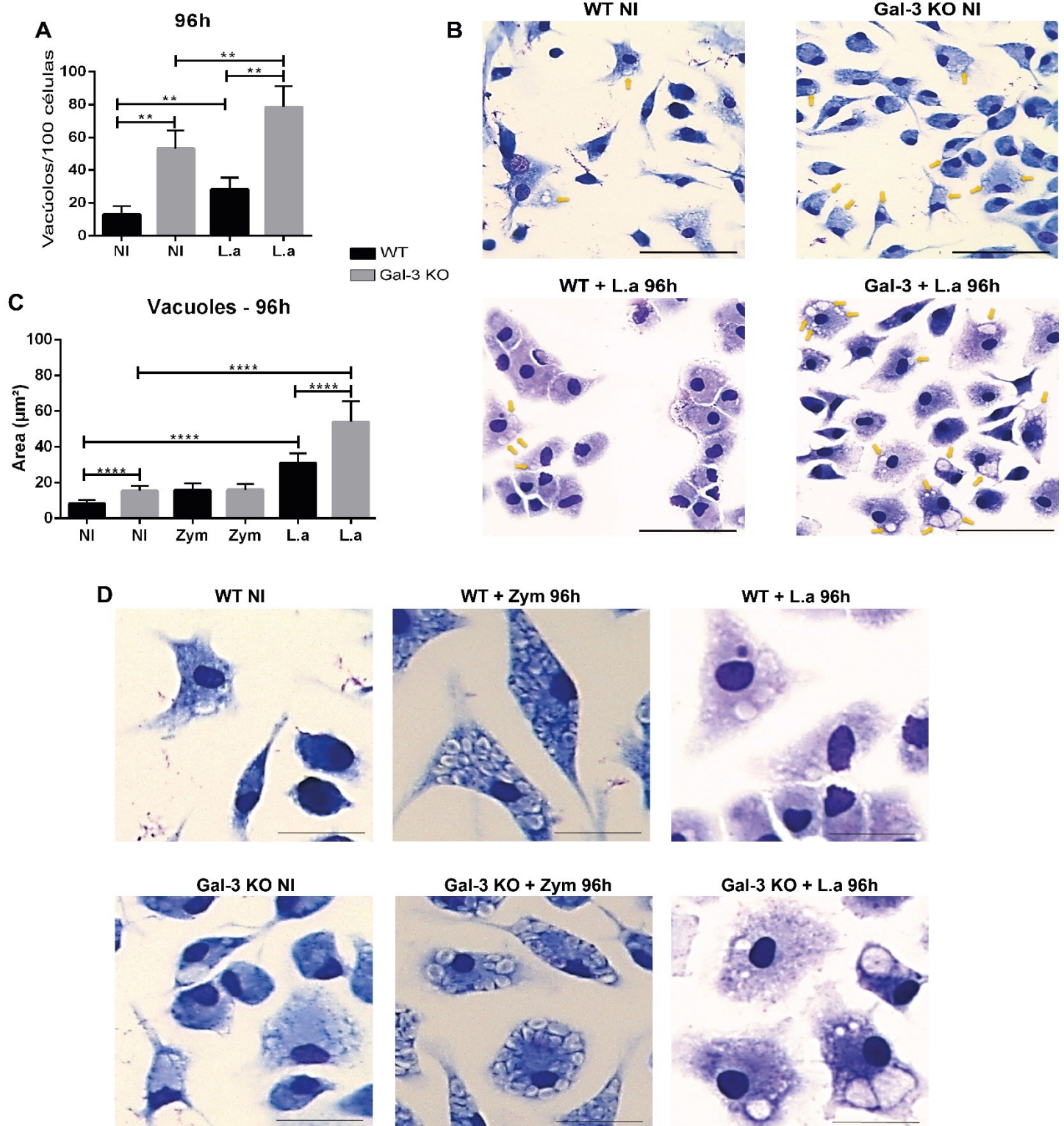


Figura 7. A ausência de gal-3 favorece a formação de vacúolos gigantes em macrófagos peritoneais infectados por *L. (L.) amazonensis* *in vitro*. Ensaio de replicação foi realizado utilizando macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. As células foram fixadas e coradas em Giemsa. Células não infectadas ou com zymosan foram usadas como controles. **(A)**. Número de vacúolos/100 células após 96 horas. **(B)**. Imagens representativas de células WT e gal-3 KO, infectadas ou não, após 96 horas, (barras de escala = 50 μm). NI = Não infectado. As setas destacam os vacúolos formados nas células. **(C)**. Quantificação da área dos vacúolos após 96 horas. **(D)**. Imagens representativas das células WT e gal-3 KO sem infecção ou na presença de zymosan ou *L. (L.) amazonensis* após 96 horas (barras de escala = 20 μm). Zym = Zymosan. Os dados representam a média \pm DP. Os ensaios foram realizados três vezes, de forma independente. As comparações entre WT e gal-3 KO foram realizadas com o teste de Mann-Whitney bicaudal (GraphPad prism 6.01.). ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

4.4 Gal-3 modula o recrutamento de leucócitos durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*

Para obter informações sobre o recrutamento de leucócitos para o local da infecção por *L. (L.) amazonensis*, nós infectamos, via intraperitoneal, camundongos WT e gal-3 KO e, após os tempos de 4 e 96 horas, quantificamos o número de neutrófilos, linfócitos e macrófagos recrutados. No tempo de 4 horas foi observado maior recrutamento de neutrófilos no grupo WT e de macrófagos no grupo gal-3 KO (**Figura 8A, B**). Já no tempo de 96 horas, foi observado maior recrutamento de linfócitos no grupo WT, e de macrófagos nos animais gal-3 KO (**Figura 8C,D**).

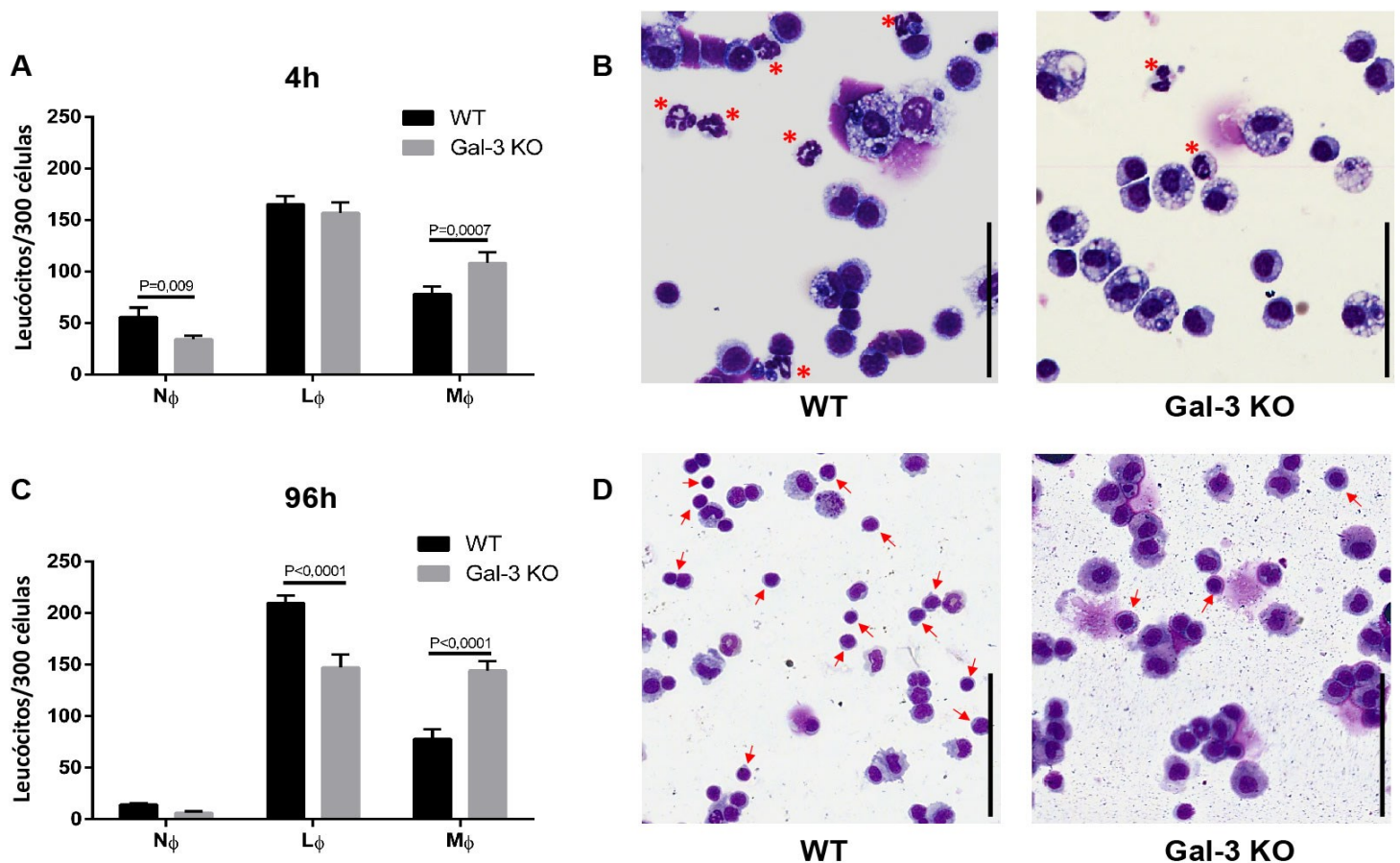


Figura 8. Recrutamento de leucócitos durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Ensaios de invasão e replicação com macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO infectados com *L. (L.) amazonensis*. As células foram fixadas e coradas com Giemsa. **(A)**, Número de leucócitos/300 células após 4 horas de invasão. **(B)**, Imagens representativas de leucócitos WT e gal-3 KO após 4 horas de invasão por *L. (L.) amazonensis*, (barras de escala = 50 μ m). Os asteriscos indicam neutrófilos. **(C)**, Número de leucócitos/300 células após 96 horas de replicação. **(D)**, Imagens representativas de leucócitos WT e gal-3 KO após 96 horas de replicação de *L. (L.) amazonensis*, (barras de escala = 50 μ m). As setas indicam linfócitos. N ϕ = neutrófilos; L ϕ = linfócitos; M ϕ = macrófagos. Os dados representam a média \pm DP. Este ensaio foi realizado três vezes, independentemente. A comparação entre WT e gal-3 KO foi realizada com o teste two way-ANOVA (GraphPad prism 6.01.).

4.5 A ausência de gal-3 leva ao aumento da carga parasitária nas patas e linfonodos de camundongos gal-3 KO *in vivo*

Para uma compreensão mais ampla do impacto da gal-3 durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*, realizamos experimentos *in vivo*. Esses ensaios foram feitos pela infecção das patas posteriores de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO, por formas promastigotas do parasito, com o objetivo de analisar a infecção durante 8 semanas. As patas foram medidas semanalmente. Após o período, os animais foram eutanasiados, e as patas, linfonodos popliteais e baços foram analisados.

Os resultados mostraram que no grupo gal-3 KO, houve aumento da área das patas em relação ao grupo WT a partir da quinta semana de infecção (**Figura 9A**), o que pode ser evidenciado na imagem representativa (**Figura 9B**). Para avaliar a importância da gal-3 no parasitismo após 8 semanas de infecção, os linfonodos popliteais e patas foram usados para mensurar e comparar a carga parasitária nos grupos WT e gal-3 KO. Os resultados mostraram que a quantidade de *L. (L.) amazonensis* nas patas (**Figura 9C**) e nos linfonodos (**Figura 9D**) dos camundongos gal-3 KO foi maior em relação ao grupo WT. Estes dados corroboram com o aumento da área das patas no grupo gal-3 KO, bem como o que foi visto nos ensaios de invasão e replicação *in vitro*.

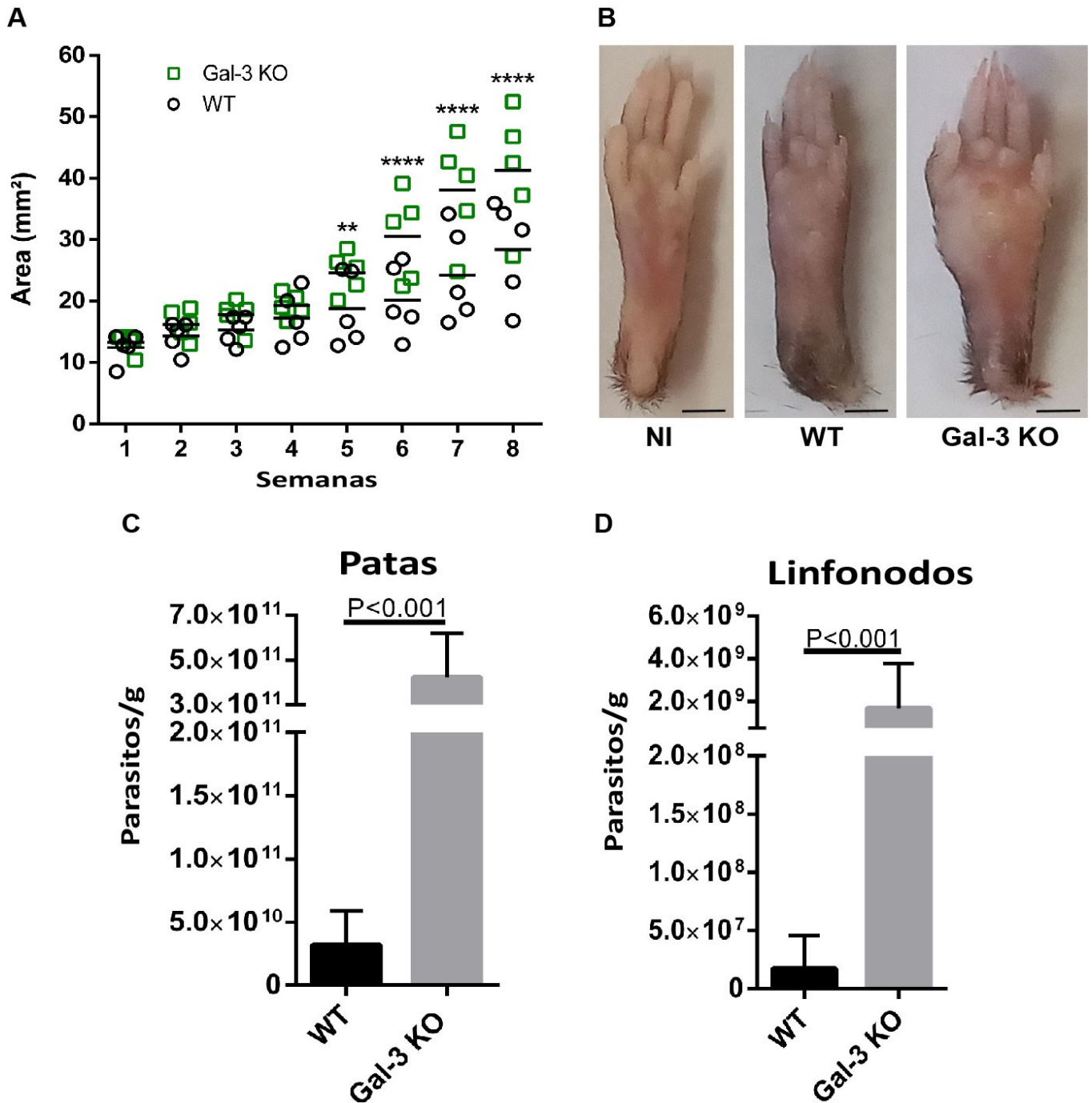


Figura 9. Efeitos da ausência de gal-3 na infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 *in vivo*. As patas de camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO foram infectadas por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^7 /pata). Após 8 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados. **(A).** Medida da área das patas ao longo de 8 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. **(B).** Imagens representativas das patas de camundongos WT e gal-3 KO ao final de 8 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*, (barras de escala = 1 cm). NI = Não infectado. **(C).** Número de parasitos/g em tecidos das patas de camundongos WT e gal-3 KO após 8 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. **(D).** Número de parasitos/g em tecidos de linfonodos popliteais de camundongos WT e gal-3 KO após 8 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. Os dados representam a média \pm DP. Este ensaio foi realizado três vezes, independentemente. A comparação entre WT e gal-3 KO foi realizada com o teste two way-ANOVA (GraphPad prism 6.01.). ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

4.6 A ausência de gal-3 leva a uma resposta inflamatória mais intensa nos tecidos de camundongos gal-3 KO *in vivo*

Também realizamos a análise histopatológica da infecção *in vivo*. Para isso, cortes histológicos do baço, linfonodo do poplíteo e pata foram corados em HE e analisados por patologistas. A análise histopatológica das patas mostrou a presença de neutrófilos no grupo gal-3 KO, característico de uma infecção persistente não controlada. Além disso, neste mesmo grupo, houve aumento de macrófagos, necrose (**Figura 10D**) e edema, indicando inflamação intensa nos animais KO, quando comparados aos animais WT (**Tabela 1**). No tecido esplênico, os animais gal-3 KO apresentaram aumento dos centros germinativos e desorganização estrutural do tecido (**Tabela 2**), mostrado na **Figura 10F**. Resultado semelhante ocorreu nas lâminas histológicas dos linfonodos popliteais, nas quais os animais KO apresentaram resposta inflamatória intensa, caracterizada por aumento de macrófagos e centros germinativos em comparação aos animais WT (**Tabela 3**).

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

Critérios Histológicos	WT	Gal-3 KO
Resposta Inflamatória	Difuso crônico (++)	Difuso crônico (+++)
Neutrófilos	-	+
Macrófagos	++	+++
Linfócitos	+	+
Plasmócitos	+	+
Células gigantes de corpo estranho	-	-
Necrose	+	+++
Edema	+	+++
Fibroblastos	++*	++*
Fibrose	-	+
Adipócitos	++*	++*

* Células residentes não inflamatórias

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

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

PV: Polpa Vermelha; PB: Polpa Branca.

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

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

* Células residentes não inflamatórias

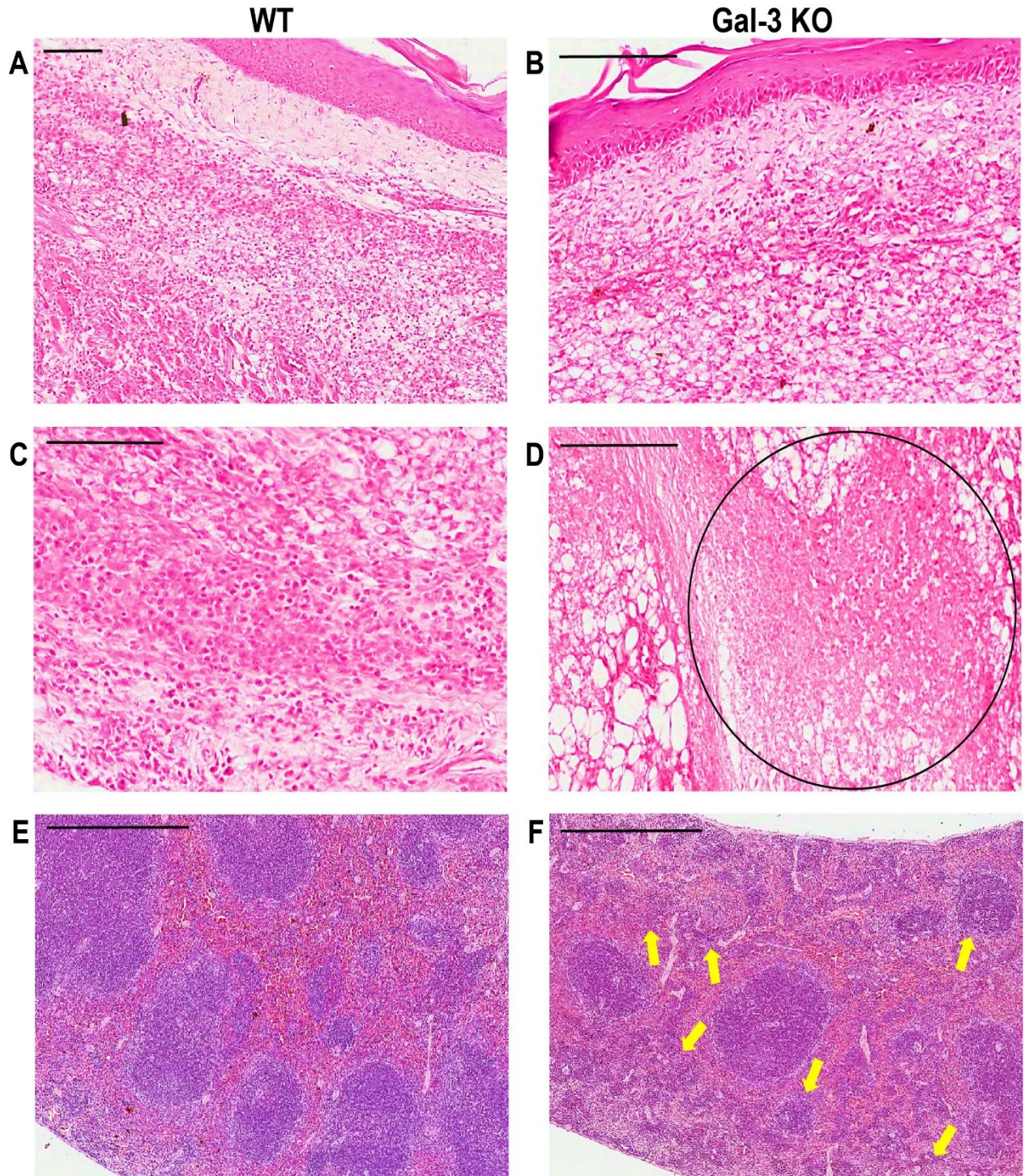


Figura 10. Análise histológica. Após 8 semanas, os camundongos foram eutanasiados e cortes histológicos das patas e baços foram corados em HE para análise da resposta inflamatória. Imagens representativas dos tecidos das patas de camundongos WT (A, C), e gal-3 KO (B, D), após 8 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. O destaque indica uma área de necrose. Barras de escala = 100 μ m. Imagens representativas do tecido esplênico de camundongos WT (E), e gal-3 KO (F), após 8 semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. Setas amarelas indicam aumento do número de centros germinativos e desorganização estrutural do tecido. Barras de escala = 500 μ m. Este ensaio foi realizado três vezes, independentemente.

4.7 A ausência de gal-3 aumenta a morte celular em leucócitos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados por L. (L.) amazonensis

Com base na evidente presença de necrose no tecido dos camundongos KO, analisamos se a ausência da gal-3 poderia causar aumento da necrose e apoptose nas células infectadas por *L. (L.) amazonensis*. Para isso, células de camundongos C57BL/6 WT e KO infectados por *L. (L.) amazonensis* foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio (PI), e analisadas por citometria de fluxo, com o intuito de avaliar apoptose e necrose, respectivamente. Os resultados mostraram que o grupo KO apresentou mais apoptose e necrose (**Figura 11C**). Esses dados sugerem um papel para gal-3 na prevenção da morte de células infectadas por *L. (L.) amazonensis*.

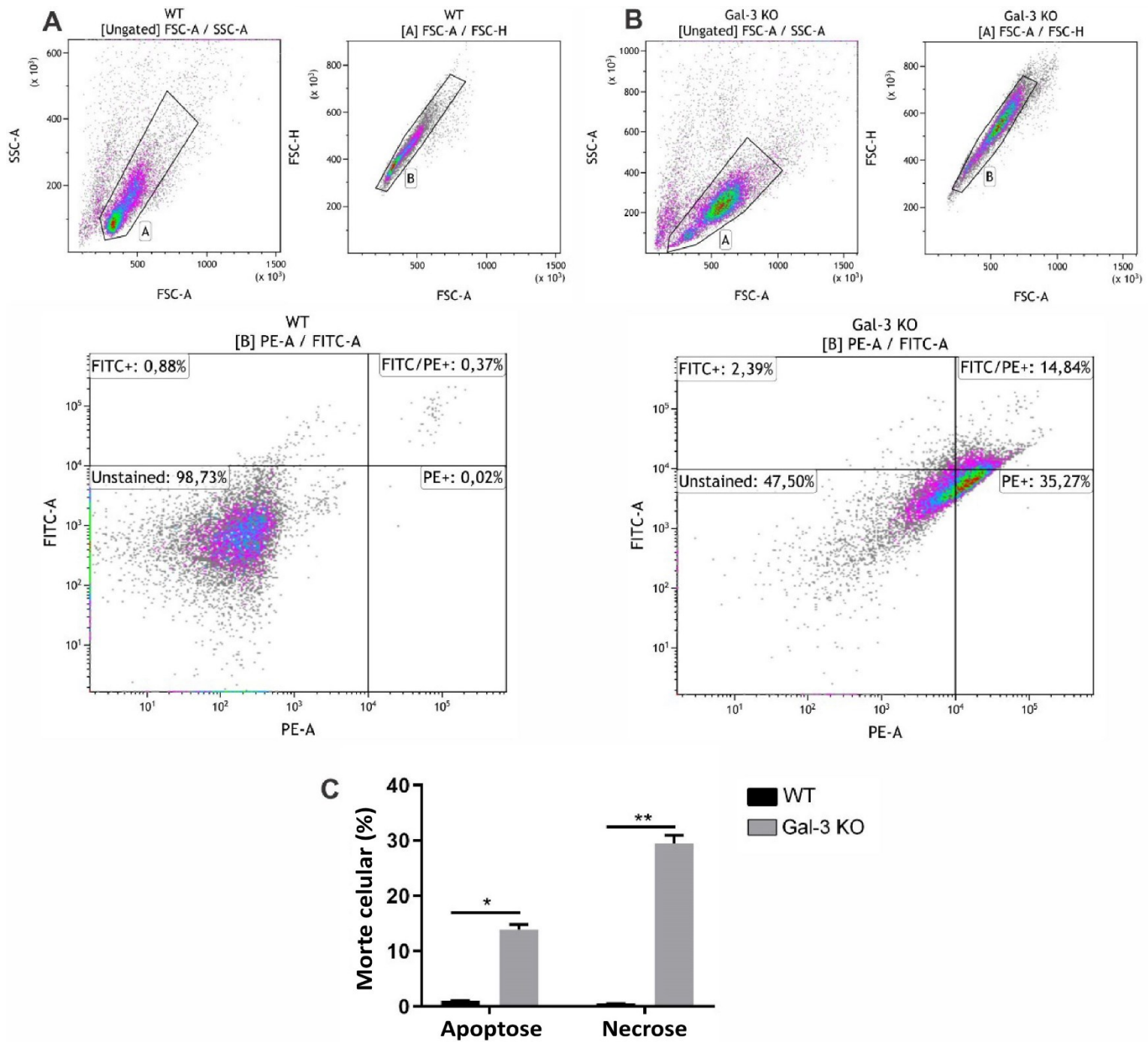


Figura 11. A falta de gal-3 aumenta a morte celular em células peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados por *L. (L.) amazonensis*. Camundongos C57BL/6 WT e gal-3 KO foram infectados intraperitonealmente com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Após 96 horas de infecção, as células peritoneais foram recuperadas e marcadas com anexina V e PI para análise de apoptose e necrose, respectivamente. Imagens representativas de células WT (A), e gal-3 KO (B), são mostradas. (C). Porcentagem de morte celular por apoptose ou necrose. * P < 0,05, ** P < 0,01. Este ensaio foi realizado três vezes, independentemente.

5.0 DISCUSSÃO

Estímulos inflamatórios microbianos ou não microbianos podem aumentar a expressão de gal-3 em vários tipos de células. Entre os estímulos microbianos, gal-3 mostrou ser superexpressa em células epiteliais gástricas infectadas por *Helicobacter pylori* (LIM et al., 2003; FOWLER et al., 2006); e infecções por *Neisseria meningitidis* levam a um aumento na expressão de gal-3 em baços de camundongos infectados e em humanos com infecção meningocócica (QUATTRONI et al., 2012). Os dados desses autores estão de acordo com os nossos que revelaram maior expressão de gal-3 nas células peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*, observada na citometria de fluxo. Isso implica um papel para gal-3 nessas infecções.

Observamos que a expressão celular da gal-3 mudou com a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Nas células não infectadas, observamos gal-3 expressa por todo o citoplasma, distribuída homogeneamente. Porém, nas células infectadas, notamos maior expressão da proteína, principalmente próxima aos parasitos fagocitados. Algo semelhante foi observado em um estudo para avaliar o papel da gal-3 na infecção por *T. cruzi*, realizada por Machado et al. (2014), onde foi visto que gal-3 é recrutada para o local de entrada de amastigotas extracelulares nos macrófagos e posteriormente se acumula ao redor dos parasitos. O aumento de gal-3 na proximidade de vacúolos contendo *L. (L.) amazonensis* pode sugerir um papel da proteína como PRR, o que já foi estudado por Sato et al. (2014), onde foi visto que gal-3 atuou como receptor, reconhecendo a molécula gal β 1-3 na superfície de *Leishmania major*. Então, durante a fagocitose, é possível que a gal-3 migre até o sítio de entrada de *L. (L.) amazonensis* na célula e reconheça PAMPs na superfície do parasito. Dessa forma, gal-3 desempenha a função de auxiliar as células do sistema imune no reconhecimento de *L. (L.) amazonensis*, desencadeando uma resposta em combate ao patógeno.

Estudos anteriores demonstraram a importância da gal-3 no controle da invasão e replicação em infecções por tripanossomatídeos como *L. major* e *T. cruzi* (BHAUMIK et al., 2013; DA SILVA et al., 2017). Porém, no caso de *L. (L.) amazonensis*, não há informações a respeito. Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, realizado por Da Silva et al. (2017), o papel do gal-3 na infecção por *T. cruzi* foi estudado. Semelhante ao que foi visto em nossos resultados, no ensaio de replicação, um aumento no número de parasitas foi observado nos macrófagos gal-3 KO quando comparados ao WT. A maior invasão e replicação do parasito no grupo gal-3 KO observada em diferentes ensaios com *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*, demonstra

que na ausência de gal-3, os macrófagos tendem a ser mais suscetíveis à infecção, fornecendo, assim, evidências *in vitro* de que esta proteína desempenha um papel importante no controle da proliferação por parasitos intracelulares.

Após entrar no organismo do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas, sofrem diferenciação em amastigotas e são localizadas em compartimentos chamados fagossomas. Estes, então, sofrem um processo de maturação que resulta na formação do VP, no qual o parasito se diferencia e posteriormente se multiplica (ANTOINE et al., 1990; STUART et al., 2008; REAL e MORTARA, 2012). Nossos resultados mostraram que em células infectadas por *L. (L.) amazonensis*, o grupo gal-3 KO apresentou maior número e área de VPs do que o grupo WT. Porém, nas células com presença de zymosan, não houve diferença no tamanho dos vacúolos entre os grupos WT e gal-3 KO, após 96 horas. O fato dos VPs presentes nas células infectadas por *L. (L.) amazonensis* serem maiores que os vacúolos formados nas células na presença de zymosan, demonstra a importância do parasito na formação de vacúolos maiores. Além disso, vimos que em células sem infecção, o grupo gal-3 KO também apresentou maior formação de vacúolos, em comparação com o grupo WT. Este aumento do número de vesículas observado em células gal-3 KO não infectadas, sugere que, na ausência da proteína, as células peritoneais dos camundongos tendem a formar mais desses compartimentos. Esses dados demonstram um papel de gal-3 na formação de vacúolos. Diferente de outras espécies do gênero *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de fundir vacúolos individuais, formando vacúolos maiores, que diluem as proteases presentes nos lisossomos, permitindo que o parasito se transforme em amastigota resistente a enzimas. E sabe-se que a formação desses grandes vacúolos ocorre a partir da fusão de fagossomas com outras vesículas endocíticas durante o tráfego intracelular (ANTOINE et al., 1990; CANTON et al., 2012; REAL e MORTARA, 2012). Assim, no grupo gal-3 KO, o parasito encontra um ambiente mais favorável, e aproveita a ausência da gal-3 nas células para formar mais VPs gigantes e estabelecer a infecção, o que pode explicar o aumento da invasão e replicação observadas nos macrófagos gal-3 KO.

Além de interagir diretamente com os agentes patogênicos, a gal-3 pode afetar o curso de uma infecção devido aos seus efeitos nas células do sistema imune (DÍAZ-ALVAREZ e ORTEGA, 2017). Vários estudos sugerem um papel importante para gal-3 no recrutamento de leucócitos em infecções, por exemplo: a alta expressão da proteína e um aumento da infiltração de neutrófilos foram detectados nas pequenas vias aéreas de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica grave (PILETTE et al., 2007); em um estudo de infecção oral por

Toxoplasma gondii, foi verificado que camundongos gal-3 KO apresentaram resposta inflamatória reduzida no intestino, fígado e cérebro, em comparação com animais WT (BERNARDES et al., 2006). Sabe-se que os leucócitos mais abundantes no sangue humano são os neutrófilos. Eles são conhecidos por sua alta capacidade microbicida e por serem as primeiras células imunes efetoras especializadas a atingir os locais de infecções por patógenos (ABBAS et al., 2015; DÍAZ-ALVAREZ e ORTEGA, 2017). Em concordância com os achados de Bhaumik et al. (2013), observamos nas primeiras quatro horas de infecção maior número de neutrófilos nos animais WT. Este resultado sugeriu que as atividades da gal-3 como DAMP ou PAMP possam ter desencadeado a resposta inflamatória e induzido uma maior migração de neutrófilos para os locais de infecção. A maior presença de neutrófilos também pode explicar a menor carga parasitária observada no grupo WT, que seria resultado da ação microbicida desses fagócitos. O papel de gal-3 como DAMP, também pode explicar o maior número de linfócitos observado no grupo WT, 96 horas após a infecção, e também a menor carga parasitária vista no ensaio de replicação. Além disso, creditamos que o maior recrutamento de macrófagos no grupo gal-3 KO tenha ocorrido como um mecanismo de compensação, devido ao menor recrutamento de neutrófilos no tempo de 4 horas, e de linfócitos no tempo de 96 horas. No entanto, os macrófagos recrutados no grupo KO controlaram a infecção de forma reduzida, devido à ausência da proteína.

Estudo anterior demonstrou mudanças inflamatórias e estruturais no tecido esplênico em animais infectados por *L. chagasi*. Dentre as alterações, os autores verificaram maior incidência de periesplenites, granulomas, desorganização estrutural e atrofia dos folículos linfoides e da zona marginal (SANTANA et al., 2008). Em concordância com estes achados, nossos dados demonstraram alterações esplênicas em camundongos gal-3 KO, o que pode sugerir um potencial agravamento da infecção, indicando a possibilidade de visceralização da leishmaniose.

Órgãos linfoides secundários como o linfonodo e o baço possuem agregados de células denominadas folículos. Alguns folículos possuem áreas centrais de grande proliferação de células B chamadas centros germinativos, que se desenvolvem em resposta à estimulação antigênica, permitindo a geração de células de memória. A maior presença destes centros germinativos nos cortes histológicos do linfonodo e baço, assim como o aumento do recrutamento de macrófagos, sugerem uma resposta inflamatória mais intensa nos animais gal-3 KO. Estes achados corroboram com o aumento da área das patas, com o perfil inflamatório, bem como, com o aumento da carga parasitária visto nos camundongos KO. Acreditamos que

este aumento da resposta imune esteja ocorrendo na tentativa de elucidar a infecção, porém sem sucesso. De forma geral, ao analisar o perfil inflamatório nos órgãos coletados, o efeito da ausência da gal-3 na resposta inflamatória dos camundongos KO é evidente.

Dentre as inúmeras funções da gal-3, seu envolvimento no processo de morte celular é um dos aspectos mais explorados por diferentes grupos de pesquisa (YU et al., 2002; OKA et al., 2005; XUE et al., 2017). Sendo assim, investigamos a ação da proteína neste contexto na infecção por *L. (L.) amazonensis*, e vimos que nas células gal-3 KO, houve um grande aumento de apoptose. Desta forma, especificamente na infecção por *L. (L.) amazonensis*, gal-3 parece agir como uma molécula antiapoptótica. De forma semelhante, em pesquisa realizada por Yu et al. (2002), foi visto que gal-3 reprime a apoptose ao interagir com a proteína repressora Bcl-2 e formar heterodímeros. Além disso, em células de carcinoma de mama humano BT549, foi relatado que a gal-3 transloca-se para as membranas mitocondriais em resposta à um estímulo apoptótico gerado pela administração de cisplatina. Essa translocação de gal-3, seria motivada por uma proteína que se liga a fosfolipídios, chamada anexina A7. Portanto, Bcl-2 e anexina A7 são dois possíveis ligantes envolvidos na atividade antiapoptótica da gal-3 vista em nossos ensaios.

Além de mais apoptose, observamos por citometria de fluxo, que as células gal-3 KO também apresentaram maior presença de necrose, o que sustenta o tecido necrosado encontrado durante a análise histológica das patas no ensaio *in vivo*. A associação entre gal-3 e necrose foi estudada por Aboulhagag et al. (2018), onde foi vista uma relação inversa entre a expressão de gal-3 e a presença de necrose tumoral em células renais. Neste estudo, a alta expressão da proteína no tecido renal normal e a baixa expressão em tumores com presença de hemorragia e necrose proeminente sugerem um papel antinecrótico da gal-3 no carcinoma de células renais. Assim, acreditamos que a gal-3 também possa ter um importante papel antinecrótico durante a infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6.

6.0 CONCLUSÃO

Nossos achados *in vivo* corroboram com os resultados observados *in vitro*, demonstrando que os animais gal-3 KO são mais susceptíveis ao desenvolvimento das lesões nas patas e ao estabelecimento da infecção. Portanto, mesmo utilizando um modelo animal de resistência para infecção por *L. (L.) amazonensis* (C57BL/6), que possui diferentes mecanismos

de resposta contra protozoários intracelulares, a deficiência em gal-3 resultou no aumento da susceptibilidade do animal à infecção.

Assim, nossos dados sugerem que a gal-3 desempenha um papel importante no curso da infecção por *L. (L.) amazonensis*, agindo no controle da invasão e replicação do parasito, na formação de vacúolos celulares gigantes, contendo a morte celular por apoptose e necrose e controlando a carga parasitária durante a infecção *in vivo*. Além disso, a gal-3 tem papel no recrutamento de células do sistema imunológico, como os linfócitos, neutrófilos e macrófagos, evidenciado em ambas as abordagens do presente estudo. Deste modo, fica evidente um papel protetor da gal-3 na promoção de uma resposta imune contra o parasito.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; et al., *Imunologia Celular e Molecular*. 8º ed. Rio de Janeiro, 2015.

AGRWAL, N.; SUN, Q.; WANG, S. Y.; WANG, J. L. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14932–9, 1993. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)82422-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82422-X)

ANTOINE, J. C.; PRIMA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amzonensis* infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect. Immun.**, v. 58(3), n. 3, p. :779-787, 1990. <https://doi.org/10.1128/IAI.58.3.779-787.1990>

ANTOINE, J.-C.; PRINA, E.; COURRET, N.; LANG, T. *Leishmania* spp.: on the Interactions They Establish with Antigen-Presenting Cells of their Mammalian Hosts. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 1–68, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)58001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)58001-6)

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101–117, 2019. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>

BAMBOUSKOVA, M.; POLAKOVICOVA, I.; HALOVA, I.; et al., New Regulatory Roles of Galectin-3 in High-Affinity IgE Receptor Signaling. **Molecular and cellular biology**, v. 36, n.

9, p. 1366–82, 2016. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/MCB.00064-16>

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. **The American journal of pathology**, v. 168, n. 6, p. 1910–20, 2006. Elsevier. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050636>

BHAUMIK, P.; ST-PIERRE, G.; MILOT, V.; ST-PIERRE, C.; SATO, S. Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 190, n. 2, p. 630–40, 2013. American Association of Immunologists. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103197>

BURCHMORE, R. J. S.; RODRIGUEZ-CONTRERAS, D.; MCBRIDE, K.; et al., Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3901–3906, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630165100>

CANTON, J.; NDJAMEN, B.; HATSUZAWA, K.; KIMA, P. E. Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 937–948, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01767.x>

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; RIBEIRO, T. G.; CASTILHO, R. O.; et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015. SBMT. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0138-2015>

CHEN, H.-Y.; WENG, I.-C.; HONG, M.-H.; LIU, F.-T. Galectins as bacterial sensors in the host innate response. **Current opinion in microbiology**, v. 17, n. 1, p. 75–81, 2014. Elsevier Limited. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.006>

CHEN, J.; HAO, W.; CHANG, K.; LIU, J. Lbos 02-03 The Infiltrating Macrophage-secreted Galectin-3 Plays An Essential Role In Cardiac Fibrosis And Diastolic Function In Murine Pressure-overload Model. **Journal of Hypertension**, v. 34, p. e549, 2016. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000501503.60171.8b>

CHUNG, A. W.; SIELING, P. A.; SCHENK, M.; et al., Galectin-3 Regulates the Innate Immune Response of Human Monocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 207, n. 6, p. 947–956, 2013. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis920>

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132–141, 2002. <https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>

DAGHER, S. F.; WANG, J. L.; PATTERSON, R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 4, p. 1213–7, 1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1213>

DA SILVA, A. A.; TEIXEIRA, T. L.; TEIXEIRA, S. C.; et al. Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. November, p. 1–9, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00463>

DE MORAIS, C. G. V.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R.; et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–19, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/324915>

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9029–9053, 2015. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/molecules20059029>

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 12, p. 2061–2068, 1997. <https://doi.org/10.1084/jem.185.12.2061>

DESJARDINS, M.; HUBER, L. A.; PARTON, R. G.; GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 5, p. 677–688, 1994. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.5.677>

DÍAZ-ALVAREZ, L.; ORTEGA, E. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 9–12, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9247574>

FEIZI, T.; HALTIWANGER, R. S. Editorial overview: Carbohydrate–protein interactions and glycosylation: Glycan synthesis and recognition: finding the perfect partner in a sugar-coated life. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 34, p. vii–ix, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.10.005>

FONSECA, S. G.; ROMÃO, P. R. T.; FIGUEIREDO, F.; et al., TNF- α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 8, p. 2297–2306, 2003. <https://doi.org/10.1002/eji.200320335>

FOWLER, M.; THOMAS, R. J.; ATHERTON, J.; ROBERTS, I. S.; HIGH, N. J. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 44–54, 2006. Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00599.x>

FRITSCH, K.; MERNBERGER, M.; NIST, A.; et al., Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 502, 2016. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2546-0>

GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 298–313, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.01.005>

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.08.051>

HAUDEK, K. C.; SPRONK, K. J.; VOSS, P. G.; et al., Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1800, n. 2, p. 181–9, 2010. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.005>

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Brief Definitive Report Recombinant Interleukin 12 Cures Mice Infected with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993. <https://doi.org/10.1084/jem.177.5.1505>

IPPEL, H.; MILLER, M. C.; VÉRTESY, S.; et al., Intra- and intermolecular interactions of human galectin-3: assessment by full-assignment-based NMR. **Glycobiology**, v. 26, n. 8, p. 888–903, 2016. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww021>

KADROFSKE, M. M.; OPENO, K. P.; WANG, J. L. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 349, n. 1, p. 7–20, 1998. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0447>

KANG, H. G.; KIM, D.-H.; KIM, S.-J.; et al., Galectin-3 supports stemness in ovarian cancer stem cells by activation of the Notch1 intracellular domain. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 68229–68241, 2016. Impact Journals. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11920>

KARLSSON, A.; CHRISTENSON, K.; MATLAK, M.; et al., Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 16–20, 2008. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn104>

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nature reviews. **Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>

KOBAYASHI, Y.; TATENO, H.; OGAWA, H.; YAMAMOTO, K.; HIRABAYASHI, J. Comprehensive list of lectins: origins, natures, and carbohydrate specificities. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 1200, p. 555–77, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_45

- LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V. Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe*, v. 17, n. 6, p. 452–455, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.06.004>
- LEBED, K.; KULIK, A. J.; FORRÓ, L.; LEKKA, M. Lectin-carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance. *Journal of colloid and interface science*, v. 299, n. 1, p. 41–8, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.01.053>
- LIM, J. W.; KIM, H.; KIM, K. H. Cell adhesion-related gene expression by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial AGS cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, n. 8, p. 1284–1296, 2003. Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00051-7)
- LIMA E.C.S.; MINOPRIO P.; Chagas' disease is attenuated in mice lacking $\gamma\delta$ T cells. *Infect Immun.* 64(1):215–221, 1996. <https://doi.org/10.1128/IAI.64.1.215-221.1996>
- LIU, F.-T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1572, n. 2–3, p. 263–73, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00313-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00313-6)
- LIU, F.-T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1183, n. 1, p. 158–182, 2010b. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x>
- MACHADO, F. C.; CRUZ, L.; DA SILVA, A. A.; et al., Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. *Glycobiology*, v. 24, n. 2, p. 179–184, 2014. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt097>
- MACHADO, P. D. A.; PACHECO, M.; CARNEIRO, D.; et al. Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. *Life Sciences*, v. 219, n. October 2018, p. 163–181, 2019. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.015>
- MARLOW, M. A.; DA SILVA MATTOS, M.; MAKOWIECKY, M. E.; et al. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056177>
- MILLER, M. C.; IPPEL, H.; SUYLEN, D.; et al., Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain. *Glycobiology*, v. 26, n. 1, p. 88–99, 2016. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv073>

MISHRA, B. B.; LI, Q.; STEICHEN, A. L.; et al., Galectin-3 Functions as an Alarmin: Pathogenic Role for Sepsis Development in Murine Respiratory Tularemia. (J. C. Alves-Filho, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59616, 2013. Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059616>

MISHRA, B. B.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V. J.; TIWARI, V. K. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 107–23, 2009. <https://doi.org/10.2174/138955709787001758>

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. Acta Tropica The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management : Current status and perspectives. **Acta Tropica**, v. 184, n. September 2017, p. 29–37, 2018. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020>

NDJAMEN, B.; KANG, B. H.; HATSUZAWA, K.; KIMA, P. E. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1480–1494, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01483.x>

NIO-KOBAYASHI, J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. **Anatomical Science International**, v. 92, n. 1, p. 25–36, 2017. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0366-6>

NISHI, Y.; SANO, H.; KAWASHIMA, T.; et al., Role of Galectin-3 in Human Pulmonary Fibrosis. **Allergology International**, v. 56, n. 1, p. 57–65, 2007. Elsevier. <https://doi.org/10.2332/allergolint.O-06-449>

OKA, N.; et al., Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. **Cancer Res.** 65(17):7546–7553, 2005. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1197>

PILETTE, C.; COLINET, B.; KISS, R.; et al., Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. **The European respiratory journal**, v. 29, n. 5, p. 914–22, 2007. European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/09031936.00073005>

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–29, 2015. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>

QUATTRONI, P.; LI, Y.; LUCCHESI, D.; et al., Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 1657–1675, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01838.x>

RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T.; HIRASHIMA, M.; ANDERSON, A. An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 143–158, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01986.x>

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

REAL, F.; MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of leishmania parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001518>

SACCON, F.; GATTO, M.; GHIRARDELLO, A.; et al., Role of galectin-3 in autoimmune and non-autoimmune nephropathies. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 1, p. 34–47, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.023>

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. R.; et al., Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x>

SATO, S.; BHAUMIK, P.; ST-PIERRE, G.; PELLETIER, I. Role of Galectin-3 in the Initial Control of *Leishmania* Infection. **Critical Reviews in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 147–175, 2014. Begel House Inc. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2014010154>

SATO, S.; ST-PIERRE, C.; BHAUMIK, P.; NIEMINEN, J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble β -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).

Immunological Reviews, v. 230, n. 1, p. 172–187, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00790.x>

SCOTT, P.; SCHARTON, T. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, p. 84–92, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44241.x>

SERIZAWA, N.; TIAN, J.; FUKADA, H.; et al., Galectin 3 regulates HCC cell invasion by RhoA and MLCK activation. **Laboratory Investigation**, v. 95, n. 10, p. 1145–1156, 2015. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.77>

SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O. P.; ABREU-SILVA, A. L.; D'ESCOFFIER, L. N.; CALABRESE, K. S. *Leishmania amazonensis* infection: Muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 315–318, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.006>

SUBRAMANIAN, A.; SARKAR, R. R. Perspectives on *Leishmania* Species and Stage-specific Adaptive Mechanisms. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1068–1081, 2018. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.09.004>

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; et al., Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>

SYPEK, J. P.; WYLER, D. J. Antileishmanial defense in macrophages triggered by tumor necrosis factor expressed on CD4⁺ T lymphocyte plasma membrane. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 4, p. 755–9, 1991. <https://doi.org/10.1084/jem.174.4.755>

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

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>

VAN DAMME, E. J. M. History of Plant Lectin Research. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.). v. 1200, p.3–13, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_1

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Advances in botanical research**, v. 48, p. 107-209, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)

VANNIER-SANTOS, M. A; MARTINY, A; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002. <https://doi.org/10.2174/1381612023396230>

VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 424–438, 2009. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2146>

VASTA, G. R. Galectins as Pattern Recognition Receptors: Structure, Function, and Evolution. . p.21–36, 2012. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_2

VASTA, G. R.; QUESENBERRY, M.; AHMED, H.; O’LEARY, N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 401–420, 1999. Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00020-8)

WANG, S.-F.; TSAO, C.-H.; LIN, Y.-T.; et al., Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. **Glycobiology**, v. 24, n. 11, p. 1022–35, 2014. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu064>

WEI, X. Q.; LEUNG, B. P.; NIEDBALA, W.; et al., Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 163, n. 5, p. 2821–8, 1999.

WHO | Epidemiological situation. .WHO, 2020. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 28/8/2020.

XU, D.; CHAN, W. L.; LEUNG, B. P.; et al., Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 8, p. 1485–92, 1998. <https://doi.org/10.1084/jem.188.8.1485>

XUE, J.; et al., Galectin-3 promotes caspase-independent cell death of HIV-1-infected macrophages. **FEBS J.** 284(1):97–113, 2017 <https://doi.org/10.1111/febs.13955>

YAN, X.-J.; YU, G.-F.; JIE, Y.-Q.; et al., Role of galectin-3 in plasma as a predictive biomarker of outcome after acute intracerebral hemorrhage. **Journal of the neurological sciences**, v. 368, p. 121–7, 2016. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.06.071>

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 2008. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>

YU, F.; et al., Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **J Biol Chem**. 277(18):15819–15827, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200154200>

YUKO, O.; HAKON, L.; YASUHIKO, S.; KEN-ICHI, K.; BARONDES, S. H. Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen. **Gene**, v. 99, n. 2, p. 279–283, 1991. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90139-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90139-3)

ZENG, X.; ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; SUN, X.-L. Carbohydrate–protein interactions and their biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3161–3176, 2012. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5594-y>

8.0 Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “O papel da Galectina-3 na infecção por *Leishmania amazonensis*”, protocolo nº 075/18, sob a responsabilidade de **Claudio Vieira da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 09 de novembro de 2018.

(We certify that the project entitled intitulado “O papel da Galectina-3 na infecção por *Leishmania amazonensis*”, protocol 075/18, under the responsibility of Claudio Vieira da Silva involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of November 09th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 15/12/2018 Término: 15/12/2020
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	6 Camundongo isogênico BALB/c 12 Camundongo isogênico C57BL/6 12 Camundongo Knockout C57BL/6
Número de animais	30
Peso/Idade	16g/ 4 semanas
Sexo	Fêmea
Origem/Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal – UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal – UFU

Uberlândia, 22 de novembro de 2018

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU