

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

LUANA CARVALHO LUZ

Galectina-3 (Gal-3) exerce papel chave no controle de etapas iniciais e tardias da infecção por
Toxoplasma gondii em células trofoblásticas humanas e vilos placentários

UBERLÂNDIA - MG

2024

LUANA CARVALHO LUZ

Galectina-3 (Gal-3) exerce papel chave no controle de etapas iniciais e tardias da infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas e vilos placentários

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Coorientador: Prof. Dr. Samuel Cota Teixeira

UBERLÂNDIA - MG

2024

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

L979
2024

Luz, Luana Carvalho, 1999-
Galectina-3 (Gal-3) exerce papel chave no controle de etapas iniciais e tardias da infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas e vilos placentários [recurso eletrônico] / Luana Carvalho Luz. - 2024.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.
Coorientadora: Samuel Cota 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.2024.294>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira, 1964-, (Orient.). II. Teixeira, Samuel Cota, 1993-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, nº 295 do PPGIPA				
Data:	sete de junho de dois e vinte e quatro	Hora de início:	14h00	Hora de encerramento:	16h10min
Matrícula do Discente:	12212IPA002				
Nome do Discente:	Luana Carvalho Luz				
Título do Trabalho:	Galectina-3 (Gal-3) exerce papel chave no controle de etapas iniciais e tardias da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas e vilos placentários				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização do comportamento das células trofoblásticas frente a transmissão congênita do toxoplasma gondii				

Reuniu-se, em 07/06/2024, às 14:00 horas, no Auditorio do Bloco 4K na UFU, Campus Umuarama, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos seguintes membros Titulares: Presidente: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro - ICBIM/ UFU (orientadora da candidata); Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo - ICBIM/UFU; Profa. Dra. Angélica de Oliveira Gomes - ICBN/UFTM.

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

A seguir, 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 **Eloisa Amália Vieira Ferro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 07/06/2024, às 16:11, 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 **Tiago Wilson Patriarca Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 07/06/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 07/06/2024, às 16:15, 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 **5426662** e o código CRC **67A7E946**.

Referência: Processo nº 23117.031005/2024-58

SEI nº 5426662

Dedico esse trabalho a minha mãe Karla, a
mulher com fé capaz de mover montanhas,
minha fortaleza. Ao meu pai Sebastião
Marcos, o homem de coragem que mudou
nossas vidas e oportunizou nossas conquistas.
Ao meu irmão Marcus Arthur, o menino que
me ensina sobre resiliência e adaptação. Ao
meu companheiro Wigor, meu refúgio em
meio ao caos, seu riso é minha paz.
Amo-os profundamente.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço minha querida orientadora Eloísa, por ter aberto as portas do seu laboratório e me acolhido como sua aluna ainda na graduação, você deu o voto de confiança que desabrochou em mim o amor pela ciência, te admiro como pessoa e profissional, foi um prazer compartilhar com você esses anos de trajetória.

Agradeço meu coorientador Samuel, você teve a paciência de lapidar minhas habilidades e me conduziu pelo caminho para formação de uma grande cientista, você é a base, e serei eternamente grata por ter você como referência na minha jornada, onde quer que eu esteja.

Agradeço à Professora Bellisa, obrigada por ser tão acolhedora, por acreditar na minha capacidade e nos meus sonhos, sua presença e auxílio contribuíram para a maturidade da minha mente cientista. Se hoje desejo trilhar esse caminho, você com certeza tem papel fundamental nisso.

E por fim agradeço a todos do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, que cruzaram meu caminho e de alguma maneira contribuíram para meu desenvolvimento enquanto pessoa e cientista. Em especial, por terem me acompanhado e apoiado nessa jornada tão fugaz e avassaladora que foi o mestrado, agradeço ao Guilherme de Souza, a Alessandra Rosini, a Marina Paschoalino e a Izadora Damasceno, pessoas com quem compartilhei sonhos, angústias, raivas, inseguranças, alegrias e conquistas. Vocês foram essenciais para que eu passasse pelo processo mesmo quando duvidei da minha capacidade de obter êxito nessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia que proporcionou toda a estrutura para o meu desenvolvimento profissional e foi cenário de momentos que irei recordar durante toda a vida. Agradeço aos professores, técnicos, equipe administrativa e aos demais profissionais que lutam pelo ensino público diariamente e transformam sonhos em realidade.

Agradeço às amizades que foram fundamentais nessa caminhada e proporcionaram apoio e descontração, sei que posso contar com cada uma de vocês: Ana Júlia Alvim, Bethania Dias, Giovanna Tannous, Isabella Cecílio, Karina Karla, Larissa Martins, Marianna Costa, Nathália Santos, Vitória Buzatto, Victoria Kortbawi, Ysla Cardoso.

Agradeço à Professora Neide Maria Silva por abrir as portas do seu laboratório para tudo que precisamos, mas especialmente a Iasmin Cunha e a Anna Laura por toda ajuda durante esse período.

Agradeço também a todas as mulheres gestantes que doaram suas placentas e contribuíram com os resultados desse trabalho.

Agradeço à banca avaliadora por terem aceitado o convite para avaliar e contribuir com a melhora deste trabalho.

Agradeço a todos os professores e membros do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas que de alguma forma contribuíram para minha formação como Mestre.

Agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa.

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso, o universo de cada um se resume ao tamanho de seu saber”

Albert Einstein

RESUMO

Galectina-3 (Gal-3) é uma lectina que se liga a β -galactosídeos, expressa em células do microambiente placentário. Esta lectina está envolvida em diversos processos biológicos, como a modulação do sistema imunológico e o controle de infecções parasitárias, incluindo a causada por *Toxoplasma gondii*. A infecção por *T. gondii* pode levar à transmissão congênita, causando abortos espontâneos, prematuridade e anomalias fetais. No entanto, pouco se sabe sobre o papel da Gal-3 na infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal. Este estudo teve como objetivo investigar o papel da Gal-3 na infecção por *T. gondii* no contexto gestacional. Para tanto, promovemos o knockdown da expressão de Gal-3 utilizando RNA de interferência (RNAi) em células BeWo. Em explantes de vilos placentários, utilizamos β -lactose ou o inibidor sintético GB1107. Mostramos que a diminuição da expressão de Gal-3 em células BeWo aumenta a invasão e proliferação de *T. gondii* e regula negativamente os níveis de MIF e IL-6. Resultados semelhantes foram observados em vilos placentários tratados com o inibidor sintético, destacando o papel desta lectina na modulação da resposta imune. Por outro lado, o bloqueio da Gal-3 com β -lactose levou ao controle da infecção parasitária. Coletivamente, nosso estudo revela a Gal-3 como uma proteína alvo promissora no contexto da toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: Trofoblasto, Toxoplasmose congênita, Placenta, Gal-3, Resposta imune.

ABSTRACT

Galectin-3 (Gal-3) is a lectin that binds to β -galactosides, expressed in cells of the placental microenvironment. This lectin is involved in various biological processes, such as modulation of the immune system and control of parasitic infections, including those caused by *Toxoplasma gondii*. This infection can lead to congenital transmission, causing spontaneous abortions, prematurity, and fetal abnormalities. However, little is known about the role of Gal-3 in *T. gondii* infection at the maternal-fetal interface. This study aimed to investigate the role of Gal-3 in *T. gondii* infection in the gestational context. To this end, we promoted the knockdown of Gal-3 expression using RNA interference (RNAi) in BeWo cells. In placental villous explants, we used β -lactose or the synthetic inhibitor GB1107. We showed that decreased Gal-3 expression in BeWo cells increases *T. gondii* invasion and proliferation and negatively regulates MIF and IL-6 levels. Similar results were observed in placental villi treated with the synthetic inhibitor, highlighting the role of this lectin in modulating the immune response. On the other hand, blocking Gal-3 with β -lactose led to control of the parasitic infection. Collectively, our study reveals Gal-3 as a promising target protein in the context of congenital toxoplasmosis.

Keywords: Trophoblast, Congenital toxoplasmosis, Placental, Gal-3, Immune response.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose	10
1.2. Resposta imune a <i>T. gondii</i> e durante a gestação	11
1.3. Placenta humana e linhagem de células trofoblásticas (BeWo)	13
1.4. Galectina-3 e seu papel na gestação	14
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. Cultura de células e manutenção dos parasitos	19
4.2. Coleta de placenta humana	19
4.3. Transfecção de células BeWo para o silenciamento de Gal-3	20
4.4. Western Blotting	20
4.5. Imunofluorescência para Gal-3	21
4.6. Proliferação e invasão intracelular de <i>T. gondii</i>	22
4.7. Ensaio de adesão e invasão (“verde/vermelho”)	22
4.8. Viabilidade de vilos placentários	23
4.9. Infecção por <i>T. gondii</i> nas vilos placentários	24
4.10. Detecção de citocinas	25
4.11. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1. A expressão de Gal-3 foi eficientemente reduzida em células BeWo após transfecção de shRNA	26
5.2. A diminuição da expressão de Gal-3 em células BeWo favoreceu a invasão e proliferação intracelular de <i>T. gondii</i>	27
5.3. A expressão reduzida de Gal-3 modulou negativamente os níveis de MIF e IL6 em células BeWo infectadas por <i>T. gondii</i>	29
5.4. Concentrações não citotóxicas de β -lactose inibiram significativamente a proliferação de <i>T. gondii</i> em vilos placentários de maneira dose-dependente	30
5.5. A inibição da expressão de Gal-3 em vilos placentários mediada por GB1107 contribuiu para o aumento da proliferação de <i>T. gondii</i> possivelmente através da redução dos níveis de MIF e IL6	32
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório que tem o potencial de invadir e replicar em todas as células nucleadas de vertebrados (Montoya; Liesenfeld, 2004). *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa e caracteriza-se por possuir na região anterior o complexo apical formado por estruturas especializadas como o conóide, roptrias, micronemas, anel polar, grânulos densos e microtúbulos subpeliculares provenientes do citoesqueleto, estas organelas citoplasmáticas garantem o processo de adesão e invasão celular (Laliberte; Carruthers, 2008; Blader et al., 2015; Tardieux; Baum, 2016).

Para invadir a célula hospedeira, o parasito se posiciona perpendicularmente em relação à superfície. Após o reconhecimento dos receptores de membrana, as micronemas liberam moléculas adesivas. Posteriormente as roptrias secretam proteínas importante para a formação do vacúolo parasitóforo. Os grânulos densos liberam proteínas dentro do vacúolo, garantindo que o parasito possa evadir das respostas da célula hospedeira. Além disso, as proteínas liberadas são importantes para a formação de túbulos especializados, que permitem o parasito competir com a célula hospedeira por metabólitos para a sua sobrevivência (Blader; Saeij, 2009; Souza et al., 2010; Robert-Gangneux; Dardé, 2012).

Todas essas organelas são encontradas nas três formas evolutivas do parasito: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Os taquizoítas representam a forma de multiplicação rápida, com a formação de vacúolos parasitóforos e apresentam-se na forma de arco. Os bradizoítas representam a forma de multiplicação lenta, culminando na formação de cistos teciduais, que podem abrigar de centenas a milhares de bradizoítas. Os esporozoítas estão contidos no interior de oocistos e são formados por reprodução sexuada no intestino do hospedeiro definitivo, os felinos, sendo liberados juntamente com as fezes (Blader; Saeij, 2009; Torrey; Yolken, 2013). Dentre as formas de infecção estão a ingestão de comida ou água contaminada com oocistos; ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos; transfusões de sangue ou transplante de órgãos infectados; acidentes laboratoriais; e a transmissão vertical (Montoya; Liesenfeld, 2004; Elmore et al., 2010).

Dada a ampla capacidade de infectar e proliferar em uma vasta gama de células e diferentes hospedeiros, incluindo o homem, estima-se que aproximadamente um terço da população mundial seja positiva para a toxoplasmose (Lambert; Barragan, 2010; Innes, 2010; Aguirre et al., 2019; Bigna; Tochie, 2019). A prevalência dessa protozoose pode variar de acordo com a região, sendo que na América do Norte, Sudoeste Asiático e Norte da Europa

varia de 10 a 30%, enquanto em países da região central e sul da Europa a sorologia é de 30 a 50%. Na América Latina e países tropicais africanos a prevalência é alta, podendo variar de 30 a 90% (Robert-Gangneux; Dardé, 2012; Dubey et al., 2014). Essas diferenças são associadas com a alimentação, o preparo da comida, o tratamento adequado da água e a intensidade da exposição ambiental, hábitos culturais e fatores socioeconômicos (Bolais et al., 2017).

A infecção por *T. gondii* leva ao estabelecimento da toxoplasmose, doença que geralmente cursa de maneira assintomática ou subclínica na maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados; no entanto, é responsável por graves morbidades em indivíduos imunocomprometidos e recém-nascidos (Montoya; Liesenfeld, 2004; Dubey, 2012; Rorman et al., 2006). A infecção durante ou imediatamente antes da gravidez pode resultar na transmissão vertical que ocorre devido à passagem transplacentária das formas taquizoítas de *T. gondii* que alcançam a circulação e os tecidos fetais, contudo, a gravidade dos danos fetais é dependente da idade gestacional em que a infecção se estabelece (Fallahi et al., 2018; Jeffers et al., 2018; Strang et al., 2020). Caso a gestante se infecte no primeiro trimestre da gravidez, a presença do parasito aumenta a probabilidade de aborto além de possíveis alterações neurológicas e má formação fetal, entretanto, se a infecção ocorrer no terceiro trimestre a taxa de aborto é significativamente menor, contudo, a possibilidade da transmissão do patógeno para o feto é maior, mas com menores danos potenciais ao feto (Aguirre et al., 2019; Strang et al., 2020).

1.2. Resposta imune a *T. gondii* e durante a gestação

Durante a infecção por *T. gondii*, macrófagos, linfócitos T, células “natural killers” (NK) e leucócitos polimorfonucleares são funcionalmente ativos (Lang; Gross; Luder, 2007; Yarovinsky, 2014). Células apresentadoras de antígenos (APCs) secretam citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , que podem agir em sinergia otimizando a produção de interferon (IFN)- γ (Gazzinelli et al., 1994; Miller et al., 2009; Yarovinsky, 2014).

A ativação de macrófagos por IFN- γ induz atividades antiparasitárias que incluem mecanismos oxidativos, não oxidativos e a indução da produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasito, o que implica na inibição da proliferação ou a destruição de *T. gondii* (Pfefferkorn; Rebhun; Eckel, 1986; Arranz-Solís; Mukhopadhyay; Saeji, 2020). Além disso,

algumas GTPases induzidas por IFN- γ também possuem atividades contra a infecção, pois tendem a se acumular nas proximidades do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a sua destruição (Collazo et al., 2001; Butcher et al., 2005; Zhao et al., 2009). Adicionalmente, IFN- γ favorece a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, previne a ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reativação do parasitismo no hospedeiro (Arranz-Solís; Mukhopadhyay; Saeij, 2020).

Uma vez estabelecida a resposta imune inata e o consequente processamento antigênico, inicia-se a resposta imune adaptativa mediada por células, como os linfócitos TCD4⁺, que se tornam ativos e atuam produzindo e secretando diversos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), além de induzir um aumento ainda maior nos níveis de IL-12 e IFN- γ (Miller et al., 2009; Melo; Jensen; Saeij, 2011). Contudo, uma resposta inflamatória exacerbada pode ser danosa para o hospedeiro (Melchor; Ewald, 2019). Assim, é importante haver um balanço entre os perfis das respostas Th1 e Th2. Esse balanço pode ser mediado pela produção de citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β 1, que atuam diminuindo a produção de NO em macrófagos, a atividade citotóxica de células NK e a maturação de células dendríticas (Wille et al., 2001; Miller et al., 2009; Arranz-Solís; Mukhopadhyay; Saeij, 2021).

Durante a gestação, a presença do feto e da placenta altera a imunidade e a fisiologia materna para permitir uma gravidez bem-sucedida. Nesse período, o sistema imunológico materno passa por fases distintas, caracterizadas por processos biológicos específicos (Saito; Miyazaki; Sasaki, 2006; Racicot et al., 2014). Assim, um balanço entre diferentes perfis de citocinas é necessário para o sucesso gestacional. Para que ocorra a implantação do blastocisto no endométrio e a invasão do trofoblasto, é preciso um microambiente inflamatório. Esse ambiente está associado a um aumento na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que mantêm a decídua e contribuem para o remodelamento das artérias espiraladas, permitindo maior fluxo sanguíneo para o embrião (Chen et al., 2012; Gude et al., 2004; Burton; Jauniaux; Charnock-Jones, 2007; Pollheimer; Knofler, 2012; Kim; Kim, 2017).

Apesar de o perfil pró-inflamatório ser necessário para a implantação, durante a gestação a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β 1, favorece o desenvolvimento do feto semi-alógeno. Essas citocinas são liberadas por células imunológicas maternas, como linfócitos, macrófagos, células NK uterinas, e por células fetais, como o trofoblasto (Prossler et al., 2014; Svensson-Arvelund, 2015; Gamliel et al., 2018; Wu et al., 2021). Entretanto, esse perfil anti-inflamatório pode favorecer a infecção por patógenos,

como *T. gondii*. Por outro lado, uma resposta inflamatória, como a desencadeada durante a infecção, pode causar desequilíbrio no microambiente placentário, levando a complicações gestacionais (Schminkey; Groer, 2014; Yang; Zheng; Jin, 2019; Gómez-Chávez et al., 2020).

1.3. Placenta humana e linhagem de células trofoblásticas (BeWo)

Células trofoblásticas constituem o revestimento externo do blastocisto e apresentam uma vasta gama de atividades funcionais, incluindo a implantação do embrião em um endométrio receptivo, precedido das fases de reconhecimento e adesão (Turco; Moffett, 2019). A implantação, bem como a formação de uma placenta funcional, que prove suprimento metabólico para o feto em desenvolvimento, requer um equilíbrio delicado de numerosos fatores regulatórios envolvendo uma complexa rede de comunicação entre células trofoblásticas, células decíduais e células do sistema imune (Gude et al., 2004).

Estruturalmente a placenta subdivide-se nas porções materna e fetal, constituídas pela decídua e placa coriônica, respectivamente (Burton; Jauniaux; Charnock-Jones, 2007). Na interface dessas regiões encontra-se o espaço interviloso com a presença de vilos flutuantes, extensamente banhados pelo sangue materno extravasado, que apresentam um eixo central constituído por tecido conjuntivo (mesênquima) e externamente são revestidos pelo sincitiotrofoblasto (populações celulares que se diferenciam durante a implantação) e citotrofoblasto (Gude et al., 2004; Burton; Jauniaux; Charnock-Jones, 2007; Pollheimer; Knöfler, 2012; Knöfler et al., 2019).

Há também os vilos de ancoragem, que fixam a placa coriônica à mucosa uterina decidualizada, essa fixação é viabilizada por uma coluna de células trofoblásticas (Aplin et al., 2020). Na extremidade distal desta coluna, distingue-se uma população de células que migram por entre as células decíduais, o trofoblasto extraviloso, responsável pela invasão do endométrio até o terço interno do miométrio. O principal alvo desta subpopulação celular são as arteríolas espiraladas da decídua materna que são remodeladas tornando-se dilatadas e com pouca resistência ao fluxo sanguíneo. Falhas na remodelação destas arteríolas estão associadas com várias patologias gestacionais como a pré-eclâmpsia e restrição de crescimento intrauterino (Knöfler, 2010; Pollheimer; Knöfler, 2012).

Além de participar da formação placentária, nutrição do embrião e regulação hormonal, o trofoblasto atua como barreira de proteção entre a circulação fetal e materna que precisa ser mantida intacta a fim de proteger o organismo contra o ataque de patógenos (Koga; Aldo; Mor, 2009; Pollheimer; Knofler, 2012). Nesse sentido, vários estudos buscam

entender o papel do trofoblasto na resposta imune durante a gravidez frente a diversas infecções (Da Silva et al., 2017; De Souza et al., 2021).

Células BeWo, as quais apresentam propriedades semelhantes às do trofoblasto primário, são consideradas um ótimo modelo para o estudo da interface materno-fetal (Costa et al., 2021; Rosini et al., 2022; Martínez et al., 2023). Elas foram isoladas de um coriocarcinoma humano e possuem características de trofoblasto humano, pois secretam hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênio placentário (hPL), progesterona e estradiol (Pattillo; Gey, 1968; Wolfe, 2006).

1.4. Galectina-3 e seu papel na gestação

As galectinas são um subgrupo de lectinas que contêm um ou dois domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs) com afinidade por glicanos contendo beta-galactosídeo (β -galactosídeo) (Liu; Rabinovich, 2010; Chou et al., 2018). As galectinas podem ser categorizadas em três grupos com base em suas estruturas, o primeiro grupo consiste nas galectinas prototípicas (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15), cada uma contendo um único tipo de domínio CRD. O segundo grupo compreende as galectinas em tandem (galectinas 4, 6, 8, 9 e 12), caracterizadas por apresentarem pelo menos dois CRDs distintos, mas homólogos, em uma única cadeia polipeptídica. Por fim, há as galectinas do tipo quimera, representadas exclusivamente pela galectina-3 (Gal-3), que possui um CRD na região C-terminal e um amplo domínio de ligação à proteína na região N-terminal que aumentam a avidéz de ligação ao ligante beta-galactosídeo (Nio-Kobayashi, 2017; Brinchmann; Patel; Iversen, 2018).

Gal-3 é uma proteína solúvel de aproximadamente 30 kDa (Brinchmann; Patel; Iversen, 2018). Está localizada no citoplasma e no núcleo de diversos tipos celulares, mas também é encontrada na superfície celular e na matriz extracelular (Sciacchitano et al., 2018). Devido à sua ampla distribuição, participa de diversos processos biológicos, como regulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular, apoptose, transdução de sinal, bem como interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Chou et al., 2018).

Além disso, Gal-3 participa de respostas imunes, incluindo processos inflamatórios agudos e crônicos, regulação da tolerância imunológica e recrutamento de células efetoras imunes em respostas associadas a interações patógeno-hospedeiro (Blois et al., 2007; Rabinovich; Toscano, 2009; Sato et al., 2009; Liu; Rabinovich, 2010). Esta lectina tem papéis promissores durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* (Chain et al., 2020; Pineda et al.,

2020) *Leishmania* spp. (Oliveira et al., 2021) e desempenha um papel significativo durante a infecção por *Toxoplasma gondii* (Bernardes et al., 2006; Debierre-Grockiego et al., 2010; Alves et al., 2010, 2013; Liu; Huang; Lu, 2018).

Alves e colaboradores (2010) demonstraram que Gal-3 aumenta a viabilidade e ativação de neutrófilos infectados por *T. gondii*. Além disso, Gal-3 é essencial para produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos de camundongos infectados com a cepa RH de *T. gondii* (Alves et al., 2013). Também foi relatado que Gal-3 desempenha um papel na imunidade inata, gerando um perfil pró-inflamatório e desempenhando um papel regulatório nas células dendríticas, capaz de modular a imunidade adaptativa (Bernardes et al., 2006). Gal-3 também está associada ao controle do parasitismo em camundongos infectados por via oral com *T. gondii*, desencadeando uma resposta pró-inflamatória no intestino, fígado e tecidos cerebrais (Bernardes et al., 2006). Além disso, Gal-3 pode desempenhar um papel crítico na regulação da produção de citocinas em camundongos hospedeiros infectados por *T. gondii* (Liu; Huang; Lu, 2018).

No microambiente placentário, Gal-3 desempenha um papel crucial na interação do embrião com o endométrio durante a implantação, e sua expressão pelas células endometriais é regulada pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Yang et al., 2011, 2013). Além disso, Gal-3 é expresso em diversas linhagens de células trofoblásticas, incluindo trofoblastos vilosos e extravilosos, como as linhagens BeWo e HTR-8/SVneo, respectivamente; e nas vilosidades coriônicas humanas do primeiro e terceiro trimestres de gravidez (Maquoi et al., 1997; Hutter et al., 2016; Bojić-Trbojević et al., 2019; Xiao et al., 2019).

Foi demonstrado que Gal-3 está envolvida nos processos de interação entre as células trofoblásticas e a matriz extracelular durante o processo de placentação (Maquoi et al., 1997). Nesse contexto, a baixa expressão ou ausência de Gal-3 compromete o desenvolvimento embrionário ao interferir na interação das vilosidades placentárias com o endométrio (Freitag et al., 2020a). Este fenótipo também tem sido associado ao aumento da apoptose trofoblástica, disfunção placentária, restrição do crescimento fetal e inflamação pronunciada com um infiltrado significativo de células NK, resultando em falha gestacional (Xiao et al., 2019; Freitag et al., 2020a). Além disso, foi demonstrado que a restrição do crescimento fetal está associada à falha no aumento dos níveis séricos de Gal-3 durante o segundo e terceiro trimestre de gravidez em humanos (Freitag et al., 2020a). Da mesma forma, foi relatada uma associação entre baixos níveis séricos de Gal-3 em mulheres grávidas e o desenvolvimento de diabetes mellitus gestacional (Freitag et al., 2020b).

Apesar de ser uma lectina abundante em células trofoblásticas humanas e no

microambiente placentário, não há estudos que mostram a participação funcional da Gal-3 durante a gestação frente à infecção por *T. gondii*. Portanto, estudos que investiguem a função de Gal-3 na passagem transplacentária de *T. gondii* podem esclarecer os mecanismos envolvidos na transmissão do parasito para o feto e gerar conhecimentos para o estabelecimento futuro de novas estratégias no combate à infecção congênita.

2. JUSTIFICATIVA

A passagem transplacentária de *T. gondii* é uma das maiores complicações decorrentes da infecção, podendo levar ao aborto e a más formações fetais. Para que a gestação seja bem-sucedida, é essencial a modulação do perfil imunológico materno para evitar a rejeição do feto. Gal-3 desempenha um papel importante nas interações celulares na interface materno-fetal e está relacionada com o controle de infecções por diferentes patógenos. A literatura atual tem revelado a importância de Gal-3 na promoção da função placentária adequada, bem como durante a infecção sistêmica por *T. gondii*. No entanto, não há estudos sobre a participação funcional dessa lectina durante a infecção por *T. gondii* no contexto gestacional. Diante do exposto, nossa hipótese é que a presença de Gal-3 seja importante no controle da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho visa investigar o papel funcional de Gal-3 durante a infecção experimental por *T. gondii* em células BeWo e em vilos placentários de terceiro trimestre gestacional.

3.2. Objetivos específicos

- Promover o silenciamento parcial (*knockdown*) da expressão gênica de Gal-3 em células BeWo;
- Promover o bloqueio de Gal-3 em vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional com o uso de β -lactose e inibidor sintético (GB1107);
- Quantificar os índices de adesão, invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*;
- Avaliar o papel de Gal-3 sobre o perfil de produção de citocinas anti e pró-inflamatórias por células BeWo e vilos placentários humanos infectados ou não com *T. gondii*.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultura de células e manutenção dos parasitos

Células trofoblásticas vilosas humanas (linhagem BeWo) foram adquiridas comercialmente da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 100U/mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab). As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera umidificada contendo CO₂ (5%). Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, clone 2F1) expressando constitutivamente o gene da β-galactosidase foram mantidos por passagens seriadas em células BeWo cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 2% de SFB, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina a 37°C e CO₂ (5%) (Teixeira et al., 2023). De acordo com o Comunicado N°13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU (CEP) declara que projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética pelo comitê (Anexo I).

4.2. Coleta de placenta humana

Placentas humanas de terceiro trimestre gestacional (36 a 40 semanas de gestação, N = 9) foram coletadas após partos cesáreos eletivos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), MG, Brasil. Os métodos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética pertinente com número de aprovação 5.614.590. O protocolo de pesquisa utilizando amostras de tecido humano foi realizado de acordo com as diretrizes e regulamentos.

Os tecidos placentários foram coletados seguindo critérios de exclusão conforme descrito anteriormente (Teixeira et al., 2020, 2023). Resumidamente, os tecidos placentários foram lavados em PBS 1x estéril gelado (pH=7,2) para remover o excesso de sangue e depois dissecados assepticamente para remover tecido endometrial e membranas fetais até 1h após a coleta. Vilos placentários contendo cinco a sete pontas livres foram coletadas conforme descrito anteriormente e adicionadas a microplacas de 96 poços (uma vilosidade por poço) em 200µL/poço de meio RPMI 1640 fresco suplementado com 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 10% de SFB por 24h a 37°C sob atmosfera umidificada contendo CO₂ (5%) até o procedimento experimental.

4.3. Transfecção de células BeWo para o silenciamento de Gal-3

O uso de RNA de interferência (RNAi) pode ser mediado através de dois tipos de moléculas; RNA interferente pequeno de fita dupla quimicamente sintetizado (siRNA) ou RNA em gancho curto baseado em vetor (shRNA) (Rao et al., 2009; Shan, 2010). Promovemos o knockdown de Gal-3 em trofoblastos vilosos humanos (linhagem BeWo) usando partículas lentivirais de shRNA humano, de acordo com o fabricante. Resumidamente, células BeWo ($0,5 \times 10^5$ /1,5mL/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 18h. No dia seguinte, as células estavam com 50% de confluência e foram transfectadas com 10µL de partículas lentivirais de galectina-3 shRNA (h) (SC-155994-V, Santa Cruz Biotechnology, INC) ou partículas lentivirais de shRNA controle (SC-108080) em meio contendo 10% de SFB e Polybrene (5µg/mL) (SC-134220) e incubadas por 18h a 5% CO₂ e 37°C. Posteriormente, o meio removido e alterado para meio contendo apenas 10% de SFB e as células foram deixadas proliferar por mais 24h. Posteriormente, as células BeWo foram tratadas com 3µg/mL de Puromycin (SC-108071) para selecionar populações que expressam shRNA. O meio contendo puromicina (3µg/mL) foi substituído a cada 48h por cerca de 10 dias. Finalmente, as populações selecionadas foram expandidas e testadas para determinar a expressão de Gal-3 utilizando as técnicas de Western blotting e imunofluorescência.

4.4. Western Blotting

Para verificar o silenciamento parcial de Gal-3 em células BeWo, bem como a inibição de Gal-3 em vilos placentários de terceiro trimestre gestacional previamente incubados com o inibidor sintético GB1107 (as condições detalhadas de tratamento serão apresentadas abaixo no item 4.8), realizamos o ensaio de Western Blotting, conforme descrito anteriormente (Barbosa et al., 2015). Resumidamente, células BeWo WT, BeWo shRNA controle e células BeWo shGal-3 foram coletadas da cultura e incubadas com tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 a 1%, 1% (p/v) desoxicolato de sódio e 0,1% (p/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] suplementado com inibidor de protease (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha), ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) e fluoreto de sódio (NaF) (Sigma). Posteriormente, as células passaram por três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Esses procedimentos permitiram a obtenção de lisado celular para quantificação proteica e detecção de Gal-3 por Western Blotting. O extrato protéico total foi centrifugado (10.000rpm, 15min, 4°C) e a

quantidade proteica mensurada pelo ensaio de Bradford. Em seguida, 60µg de proteínas foram separadas de acordo com seu tamanho molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), utilizando um padrão de peso molecular como controle. Posteriormente, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A membrana foi bloqueada para ligação inespecífica com leite desnatado a 4% em solução salina tamponada com TRIS (TBS: TRIS 25 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,4) por 1h e incubada por 18h com o anticorpo monoclonal anti-Gal-3 (1:1000, 14-5301-82, BioM3/38, eBioscience) diluído em TBS à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes sob agitação suave com TBS e depois incubada com o anticorpo secundário IgG anti-rato conjugado com HRP (1:2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) em TBS com 2% de leite desnatado por 2h em temperatura ambiente. A expressão de β -actina foi utilizada como controle (1:1000; SC-81178; Santa Cruz Biotechnology, INC). Finalmente, a membrana foi lavada três vezes novamente e visualizada utilizando o kit de quimioluminescência (Thermo Scientific) no ChemiDoc MP Imaging System (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

4.5. Imunofluorescência para Gal-3

A expressão de Gal-3 também foi verificada por imunofluorescência. Células BeWo Wild Type, shRNA controle e shGAL-3 ($1 \times 10^5/500\mu\text{l/poço}$) foram plaqueadas em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm e incubadas a 37°C e CO₂ (5%) por 18h. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% durante 45min à temperatura ambiente, depois lavadas com PBS 1x e incubadas durante 18h com o anticorpo monoclonal anti-Gal-3 [diluído 1:1000 em PGN (PBS contendo 0,25% de gelatina + 0,01% de saponina)] (14-5301-82, BioM3/38, eBioscience)] no escuro a 4°C. Após, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com IgG anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 e TO-PRO-3 iodide (Invitrogen Califórnia, EUA) (ambos diluídos 1:500 em PGN 0,01% saponina) por 1h no escuro a 4°C para marcar Gal-3 e o núcleo, respectivamente. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e as amostras foram analisadas usando microscopia confocal de fluorescência (40X, Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha).

4.6. Proliferação e invasão intracelular de *T. gondii*

Células BeWo Wild Type, shRNA controle e shGAL-3 (3×10^4 /100 μ L/poço) foram cultivadas em microplacas de 96 poços contendo meio RPMI e 10% de SFB, e mantidas por 18h em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1 (proporção de parasitos por célula), em meio RPMI com 10% de SFB por 3h para avaliar a invasão de *T. gondii* ou por 24h para avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii*. A invasão do parasito e a proliferação intracelular foram avaliadas usando o ensaio colorimétrico de β -galactosidase, uma reação usando o substrato reagente clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), conforme descrito anteriormente (Teixeira et al., 2023). A absorbância foi determinada em 570nm e a invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* foi descrita como o número de taquizoítas obtidos de acordo com uma curva padrão contendo taquizoítas livres (1×10^6 a $15,6 \times 10^3$), os dados foram expressos em porcentagem (% de invasão ou proliferação de *T. gondii*).

4.7. Ensaio de adesão e invasão (“verde/vermelho”)

Usamos o ensaio de coloração diferencial de anticorpos verde/vermelho para confirmar o envolvimento de Gal-3 nas etapas iniciais da infecção por *T. gondii*, conforme descrito previamente (Lim et al., 2018; Teixeira et al., 2023, 2021). Células BeWo Wild Type, shRNA controle e shGAL-3 (1×10^5 /500 μ L/poço) foram cultivadas em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm e mantidas por 18h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (3:1) por 3h. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x para remover parasitos não invadidos. Em seguida, as células foram fixadas com PFA a 4% durante 15min à temperatura ambiente e foram incubadas com anticorpo primário anti-*T. gondii* policlonal feito em coelho (Abcam #20530; Waltham, MA, EUA) [diluído 1:500 em PGN (PBS contendo 0,25% de gelatina)] à temperatura ambiente por 1h, seguido por IgG anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 594 (Invitrogen, EUA #A11012; Waltham, MA, EUA) também diluído 1:500 em PGN. Em seguida, as células foram incubadas durante 1h com anticorpo primário policlonal feito em coelho anti-*T. gondii* (diluído 1:500 em PGN-0,01% saponina - solução permeabilizante) seguido de incubação por 1h com IgG anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA #A11008; Waltham, MA, EUA), e DAPI marcador para o núcleo da célula (Invitrogen, EUA) ambos diluídos 1:500 em PGN + saponina. As lamínulas foram montadas

em lâminas de vidro e as amostras foram analisadas utilizando microscopia confocal de fluorescência (40X, Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). O número de parasitos intracelulares (verde+/vermelho-) e aderidos [vermelho+ ou verde+/vermelho+ (amarelo)] foi contado em 20 campos selecionados aleatoriamente em cada lamínula montada separadamente (Fernandes et al., 2023; Teixeira et al., 2023). A proporção do número de taquizoítas intracelulares em relação ao número total de parasitos foi considerada como a razão da invasão.

4.8. Viabilidade de vilos placentários

Para bloquear a atividade da Gal-3 nos vilos placentários, utilizamos β -lactose, um açúcar que possui alta afinidade pelo sítio de ligação da lectina. Estudos anteriores demonstraram a eficácia da β -lactose na inibição dos domínios N-terminal e C-terminal desta proteína em concentrações semelhantes às utilizadas neste trabalho (Sano et al., 2000; Fernández et al., 2005; Stowell et al., 2008). Também utilizamos um inibidor sintético específico para Gal-3, que penetra nas células, GB1107 (3,4-diclorofenil 3-desoxi-3-[4(3,4,5-trifluorofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-1-tio- α -D-galactopiranosídeo), que foi generosamente fornecido por Galecto Biotech (Zetterberg et al., 2018; Vuong et al., 2019).

Primeiramente, os vilos placentários foram coletados e cultivados por 24h conforme mencionado anteriormente. Com base na literatura, os vilos placentários foram tratados ou não com β -lactose (30, 50, 100 e 150mM) por 2h ou com GB1107 (180, 150 e 120 μ M) por 24h. Adicionalmente, após as 24h de tratamento com o inibidor GB1107, o meio foi removido e substituído por meio 10% SFB livre de tratamento, e a toxicidade também foi avaliada.

A viabilidade tecidual foi medida por MTT, LDH e ensaios histológicos, de acordo com protocolos publicados (Teixeira et al., 2020). Resumidamente, após o tempo de tratamento determinado, os sobrenadantes da cultura foram coletados e a concentração de LDH medida de acordo com as instruções do fabricante com pequenas modificações (LDH Liquiform, Labtest Diagnostica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil | Ref 86-2/30, Lote 7010). Este ensaio é baseado no consumo e diminuição da absorção de NADH a 340nm, medido por uma leitora de microplacas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A LDH liberada no meio de cultura foi expressa em U/L de atividade enzimática da LDH e foi usada como marcador de integridade tecidual.

Paralelamente, na mesma condição experimental descrita acima, a viabilidade tecidual também foi avaliada pelo ensaio MTT. Após os tratamentos, os sobrenadantes da cultura foram removidos e substituídos por 200 μ L de solução de MTT [180 μ L de meio de cultura

mais 20 μL de MTT (5 mg/mL)] por 4h a 37°C e 5% de CO_2 . Posteriormente, os cristais de formazan resultante da redução do MTT foram solubilizados pela adição de uma solução contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) em 100 μL de água e N,N-dimetilormamida (DMF 1:1) por 18h, 37°C, 5% CO_2 . Finalmente, as vilosidades foram removidas de cada poço e a absorbância (570nm) foi mediada por uma leitora de microplacas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A viabilidade tecidual foi expressa em porcentagens (% de viabilidade por incorporação de MTT), sendo a absorbância das vilosidades incubadas apenas com meio de cultura (grupo não tratado) considerada 100% viável. Além disso, realizamos análises morfológicas das vilosidades tratadas para corroborar os ensaios de viabilidade. Secções de tecido de vilosidades foram coradas com hematoxilina/eosina e examinadas utilizando um microscópio óptico (X40, Scanscope AT).

4.9. Infecção por *T. gondii* nas vilos placentários

Quantificamos a proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilos placentários tratadas com β -lactose ou GB1107 usando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase. Resumidamente, as vilosidades foram coletadas e cultivadas em microplacas de 96 poços (uma vilosidade por poço/200 μL) em meio de cultura suplementado por 24h a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, as vilosidades foram tratadas nas concentrações não tóxicas de β -lactose (30, 50, 100 e 150mM) por 2h e GB1107 (120 μM) por 24h e depois infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (1×10^6 /200 μL /poço) e incubadas por 24h a 37°C e 5% CO_2 . Os vilos placentários foram coletados e armazenados a -80°C para as seguintes análises: determinação do conteúdo proteico usando o reagente de Bradford e proliferação intracelular de *T. gondii* por ensaio de β -galactosidase de acordo com protocolos publicados (Teixeira et al., 2023).

4.10. Detecção de citocinas

Os níveis das citocinas humanas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ e MIF liberadas nos sobrenadantes da cultura, produzidos pelas células BeWo ou por vilos placentários, sob as diferentes condições experimentais, foram medidos usando o ensaio de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Os dados foram expressos em pg/mL de acordo com uma curva padrão de cada citocina para células BeWo. Para explantes placentários, as concentrações de citocinas foram normalizadas usando uma razão entre a produção de citocinas (pg/mL) e seu conteúdo de proteína total correspondente (μ g/mL) de cada amostra, sendo os níveis demonstrados em pg/mg de tecido. Os limites de detecção de cada citocina foram determinados a partir de curvas padrão: IL-4 (7,8 pg/mL), IL-6 (4,7 pg/mL), IL-8 (3,1 pg/mL), IL-10 (7,8 pg/mL), TNF- α (7,8 pg/mL), IFN- γ (4,7 pg/mL) e MIF (125 pg/mL).

4.11. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média e erro padrão das médias (\pm SEM). Os dados obtidos foram submetidos à teste de normalidade, sendo que quando paramétricos, foram posteriormente analisados pelo teste One-way ANOVA com pós-teste por comparações múltiplas de Sidak, e quando não paramétricos, isto é, não validados via teste de normalidade, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste por comparações múltiplas de Dunn, utilizando o programa GraphPad Prism® Version 8.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. A expressão de Gal-3 foi eficientemente reduzida em células BeWo após transfecção de shRNA

Depois de promover o knockdown de Gal-3 em uma linhagem de células trofoblástica vilosas humanas (células BeWo) usando partículas lentivirais de shRNA, a redução da expressão de Gal-3 foi confirmada por técnicas de Western Blotting e imunofluorescência. Mostramos que a expressão proteica foi parcialmente reduzida apenas em células BeWo submetidas a partículas lentivirais de galectina-3 shRNA em comparação com os grupos controle (Wild Type e shRNA controle); além disso, a expressão de Gal-3 não foi alterada nas células BeWo submetidas às partículas lentivirais de controle de shRNA em comparação com as células BeWo Wild Type (**Figura 1A**). Em relação ao ensaio de imunofluorescência, células BeWo Wild Type (**Figura 1B**) e shRNA controle (**Figura 1C**) apresentam um padrão de expressão/distribuição homogêneo de Gal-3 (cor verde) por toda a célula, enquanto nas células BeWo shGal-3 a marcação da proteína encontra-se parcialmente reduzida (**Figura 1D**).

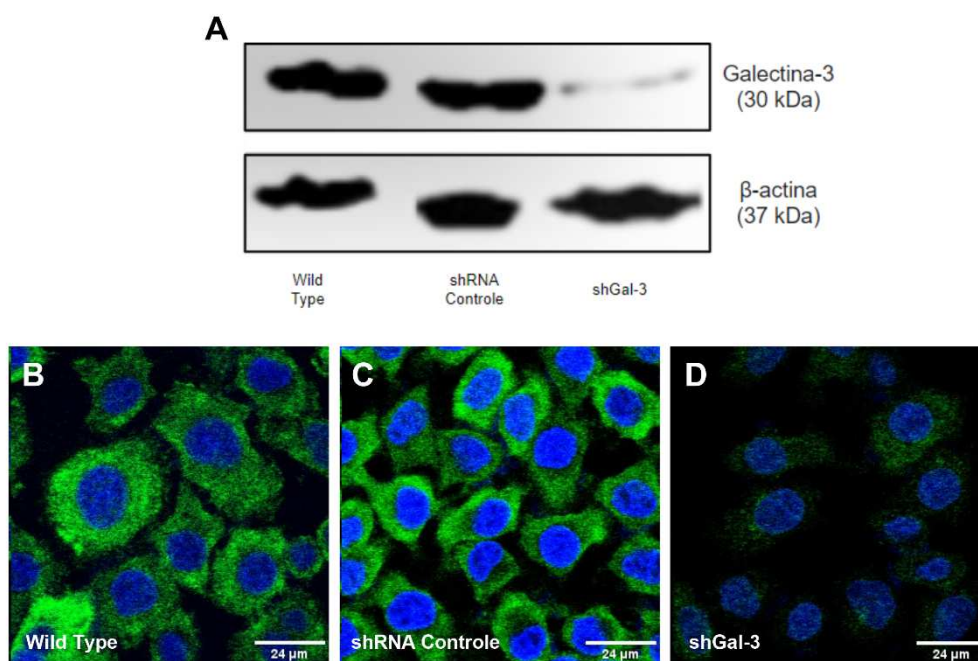


Figura 1. A expressão de Gal-3 é eficientemente reduzida em células BeWo após transfecção de shRNA. Células BeWo foram transfectadas com shRNA de Galectina-3 ou partículas lentivirais de shRNA controle. O knockdown de Gal-3 foi confirmado por Western blotting (A) e ensaios de imunofluorescência (B-D). Imagens de fluorescência representativas são demonstradas com ampliação de 40x, barra de escala 24μm. Foi realizado um experimento independente em quadruplicata.

5.2. A diminuição da expressão de Gal-3 em células BeWo favoreceu a invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*

Após a confirmação do silenciamento gênico, verificamos o impacto do knockdown da proteína na invasão e proliferação de *T. gondii* em células BeWo (Wild Type, shRNA controle e shGal-3). Avaliamos a invasão parasitária (3h) ou a proliferação intracelular (24h) utilizando o ensaio de β -galactosidase. Observamos que o knockdown de Gal-3 aumentou a invasão de parasitos em comparação com células Wild Type (*P=0,0011) ou células de controle shRNA (#P=0,0277) (**Figura 2A**). Da mesma forma, a expressão reduzida de Gal-3 em células BeWo favoreceu a proliferação de *T. gondii* em comparação com células BeWo Wild Type (*P=0,0222) ou controle shRNA (#P=0,0215) (**Figura 2B**), sugerindo Gal-3 como uma proteína chave envolvida no controle do parasitismo. Para consolidar nossos achados e confirmar a capacidade de Gal-3 em interferir nas primeiras etapas da infecção parasitária, avaliamos as taxas de adesão e invasão após 3h de infecção por *T. gondii* utilizando o ensaio de fluorescência “verde/vermelho”. Corroborando com nossas descobertas anteriores, o knockdown da proteína alvo em células BeWo resultou em um aumento significativo na taxa de invasão em comparação com células que possuem expressão normal de Gal-3 (*P=0,0076) ou células de controle de shRNA (#P=0,0322) (**Figura 2C**). Em consonância com este resultado, a diminuição da expressão de Gal-3 aumentou significativamente o número de parasitos intracelulares em relação às células Wild Type (*P=0,0246) ou células shRNA controle (#P=0,0180) (**Figura 2D**). Curiosamente, as células shGal-3 não apresentaram diferença estatística no número de parasitos aderidos em comparação com os grupos controle (**Figura 2D**). Imagens ilustrativas de fluorescência destacam os taquizoítas de *T. gondii* aderidos e intracelulares (**Figura 2 E-G**).

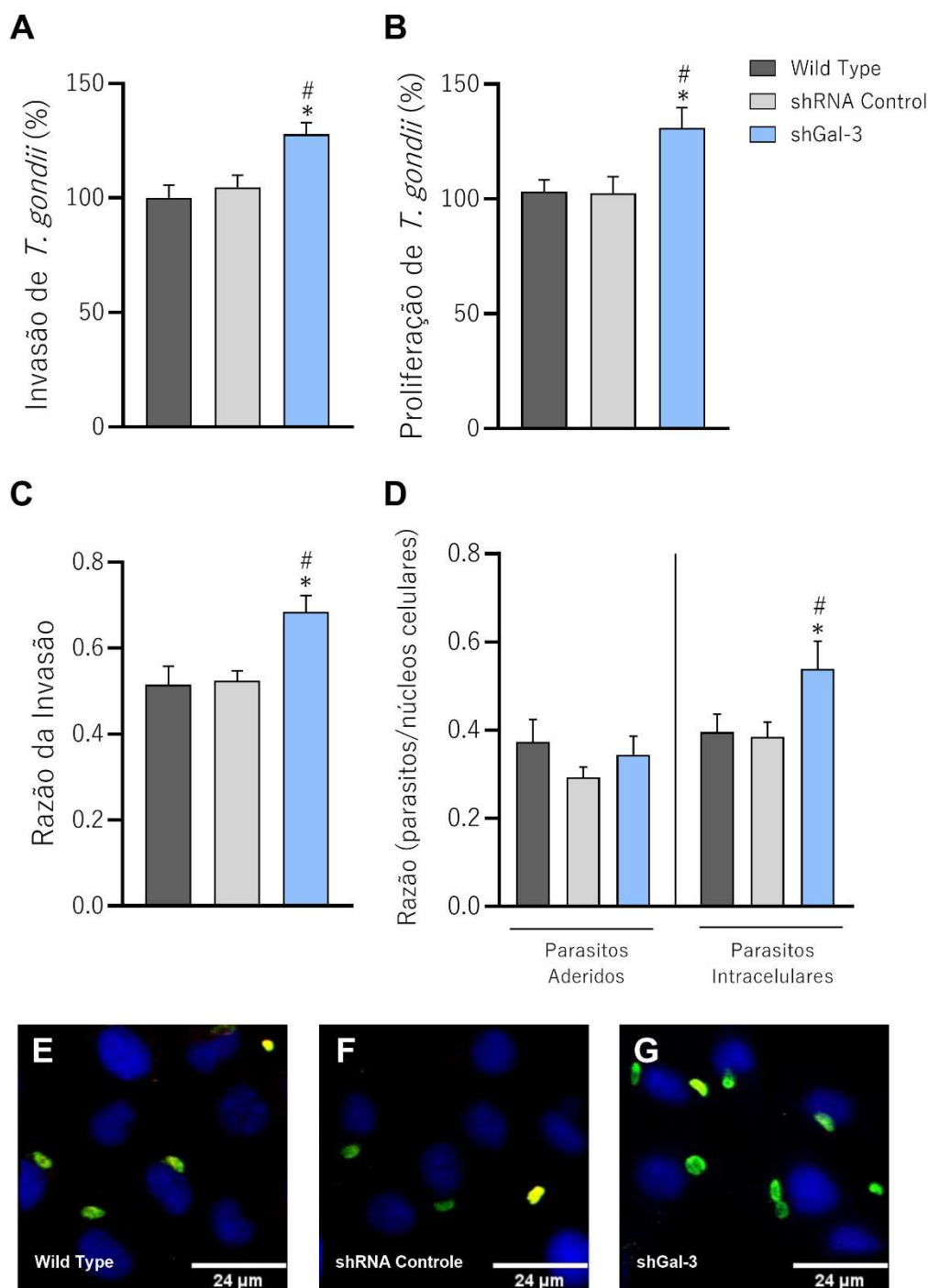


Figura 2. A baixa expressão de Gal-3 em células BeWo aumenta a invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*. (A) Células BeWo silenciadas ou não para Gal-3 foram infectadas por 3h para avaliar a invasão de *T. gondii* ou (B) por 24h para avaliar a proliferação do parasito. Em ambas as situações experimentais, o número de taquizoítas foi determinado pelo ensaio da β -galactosidase e expresso em porcentagem. Foram realizados quatro experimentos independentes em octuplicata. (C) A proporção do número de taquizoítas intracelulares em relação ao número total de parasitos foi considerada como razão de invasão. (D) O número de parasitos intracelulares (verde+/vermelho-) e aderidos [vermelho ou vermelho+/verde+ (amarelo)] foi contabilizado em 20 campos selecionados aleatoriamente e expresso como a razão do número de parasitos pelo núcleo da célula hospedeira. (E-G) Imagens representativas de fluorescência destacando o impacto da diminuição da expressão de Gal-3 na proliferação de parasitos. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata. As imagens

foram capturadas com ampliação de 40x (barra de escala: 24 μ m). *Comparação entre células shGal-3 e Wild Type; #Comparação entre shGal-3 e shRNA controle.

5.3. A expressão reduzida de Gal-3 modulou negativamente os níveis de MIF e IL6 em células BeWo infectadas por *T. gondii*

Até o momento, nossas descobertas mostraram que a redução de Gal-3 aumenta a proliferação do parasito, pois apresentam maior capacidade de invadir e replicar nas células hospedeiras. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que Gal-3 possa afetar a resposta imune do hospedeiro. Portanto, investigamos os potenciais efeitos imunomoduladores na presença ou redução desta proteína através da dosagem dos níveis de citocinas. Mensuramos os níveis de IL4, IL6, IL8, IL10, IFN γ , MIF e TNF α no sobrenadante de células BeWo sob diferentes condições experimentais. Observamos que a infecção por *T. gondii* promoveu uma forte regulação positiva nos níveis de MIF pelas células Wild Type (*P<0,0001) e shGal-3 (*P<0,0001) em comparação com as células Wild Type e células shGal-3 não infectadas, respectivamente (**Figura 3A**). Curiosamente, as células shGal-3 infectadas tiveram menor produção de MIF do que as células Wild Type infectadas (&P<0,0001) (**Figura 3A**). A redução da expressão de Gal-3 induziu uma diminuição nos níveis de IL6 em comparação com células Wild Type (^sP=0,0131). Durante a infecção por *T. gondii*, há uma forte regulação positiva de IL6 em células Wild Type em comparação com a condição não infectada (*P=0,0143), mas os níveis também se mantiveram reduzidos em células shGal-3 em comparação com células Wild Type infectadas (&P<0,0001) (**Figura 3B**). Em relação à produção de IL8, nossos dados revelaram que as células Wild Type infectadas tiveram maior produção de IL8 do que as células Wild Type não infectadas (*P=0,0323) (**Figura 3C**). Por outro lado, os níveis de IFN γ foram mais elevados em células BeWo Wild Type não infectadas em comparação com células BeWo Wild Type infectadas (*P=0,0012); além disso, na condição não infectada, as células shGal-3 mostraram uma redução na secreção de IFN γ em comparação com as células Wild Type (^sP=0,0213) (**Figura 3D**). As citocinas IL4, IL10 e TNF α não foram detectadas em sobrenadantes de células BeWo sob quaisquer condições experimentais (dados não mostrados). Juntos, esses achados sugerem que a modulação negativa de Gal-3 está associada a níveis reduzidos de citocinas essenciais pelo controle da infecção por *T. gondii* no trofoblasto.

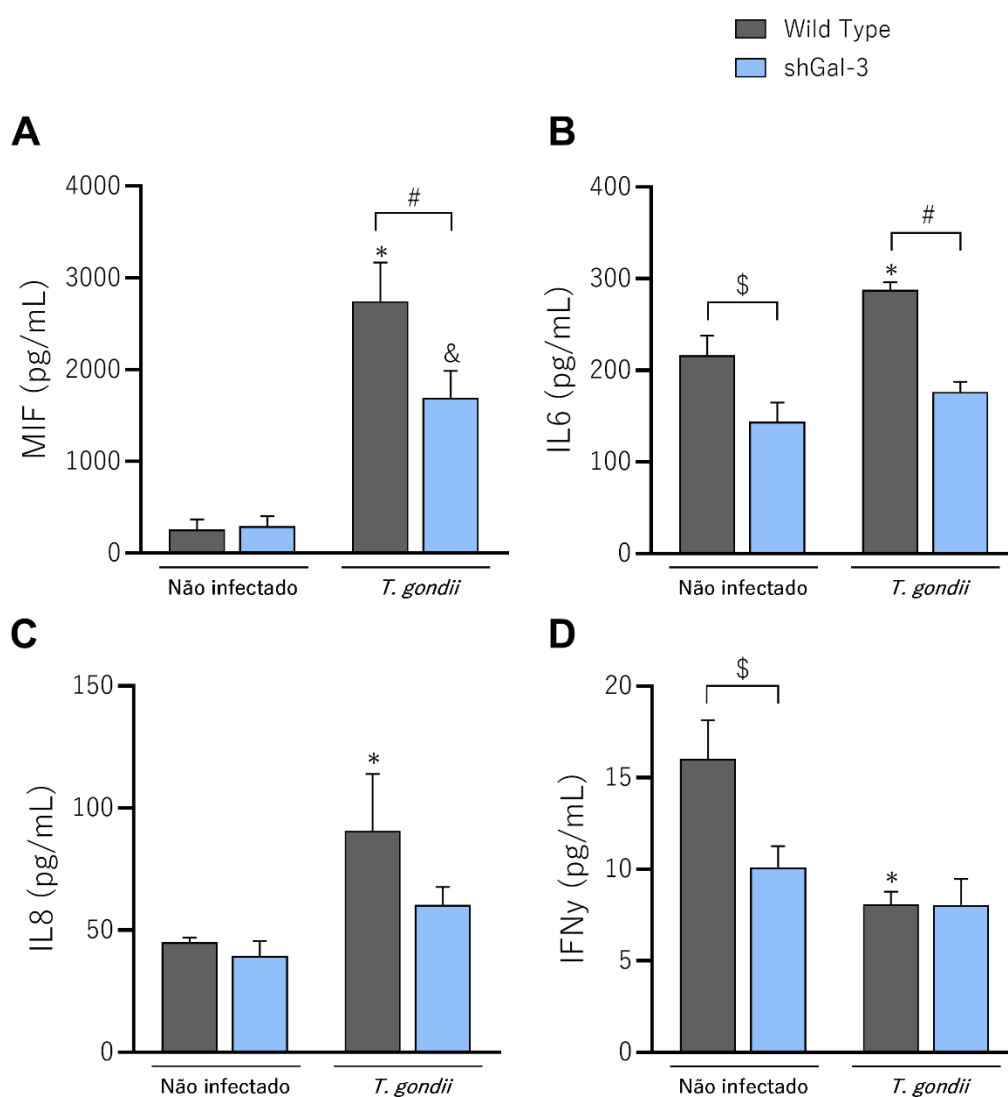


Figura 3. O knockdown de Gal-3 reduz a produção de MIF e IL6 em células BeWo infectadas por *T. gondii*. Células BeWo Wild Type ou shGal-3 foram infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii*, os sobrenadantes da cultura celular foram coletados para mensuração de (A) MIF, (B) IL6, (C) IL8 e (D) IFN γ . *Comparação entre células não infectadas/infectadas; &Comparação entre células infectadas; \$Comparação entre células não infectadas.

5.4. Concentrações não citotóxicas de β -lactose inibiram significativamente a proliferação de *T. gondii* em vilos placentários de maneira dose-dependente

A viabilidade dos vilos placentários foi avaliada após tratamento por 2h com β -lactose utilizando o ensaio MTT. O tratamento com β -lactose não foi tóxico aos vilos placentários em todas as doses testadas em relação ao grupo controle (vilos não tratados) (**Figura 4A**). Confirmando o nosso ensaio de viabilidade anterior, o ensaio LDH também revelou que a β -lactose não foi tóxica para vilos placentários em comparação com o grupo controle (**Figura**

4B). Além disso, a análise morfológica demonstrou a manutenção da integridade tecidual destacada por uma morfologia típica de células citotrofoblásticas (setas pretas) e mesênquima (M) em comparação com o grupo não tratado (**Figura 4 D-E**). Com base nesses resultados, promovemos o bloqueio de Gal-3 utilizando concentrações seguras de β -lactose e avaliamos a proliferação do parasito. Nossos dados demonstraram que doses mais altas de β -lactose (150mM, $*P<0,0001$; 100mM, $*P=0,0002$; 50mM, $*P=0,0120$) prejudicaram significativamente a proliferação do parasito quando comparadas com explantes de vilosidades não tratadas (**Figura 4C**).

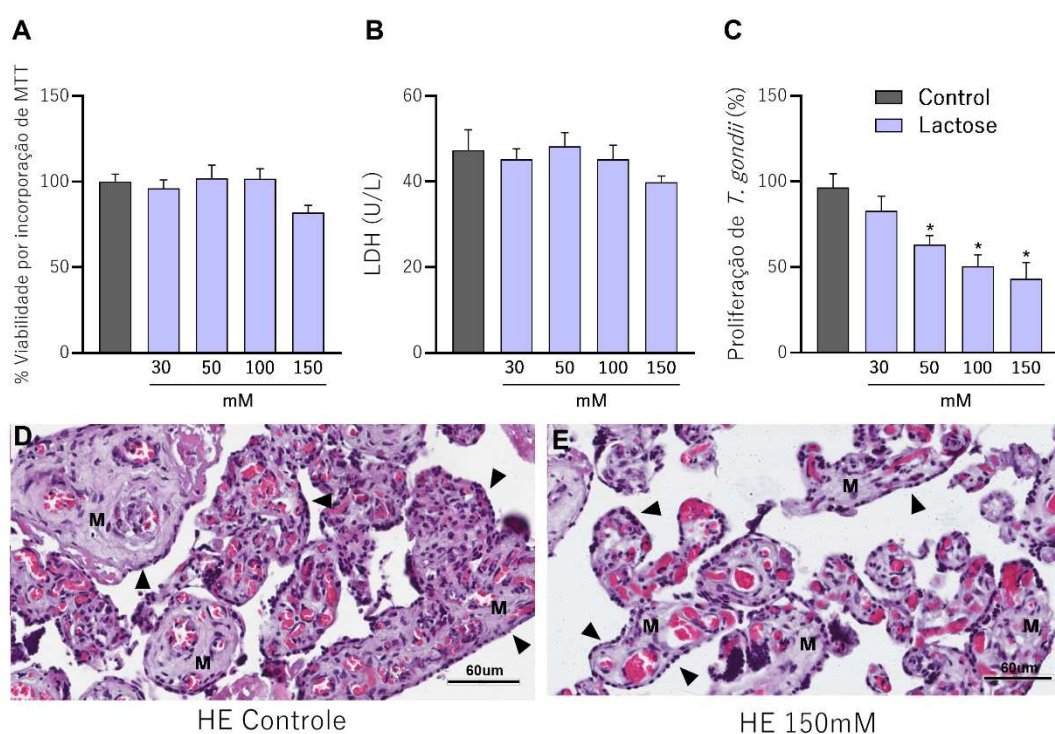


Figura 4. O tratamento com lactose não afeta a viabilidade dos vilos placentários e controla o parasitismo. Os vilos placentários foram incubados por 2h com lactose para inibir o sítio de ligação da Gal-3 (30, 50, 100 e 150mM) e apenas meio de cultura (grupo controle) e submetidos à análise de viabilidade. (A) A viabilidade dos vilos placentários foi determinada pela incorporação de MTT, o grupo controle considerou 100% da viabilidade (B) Os sobrenadantes dos vilos placentários foram coletados e usados para medir os níveis de LDH (U/L). Foi realizado um experimento independente em octuplicata. São mostradas fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) de vilos placentários tratadas com (D) meio de cultura ou (E) lactose (150mM) por 2h. As fotomicrografias foram capturadas com ampliação de 40x (barra de escala: 60 μ m). (C) Vilos placentários previamente incubados com lactose (30, 50, 100 e 150 mM) foram infectados com taquizoítas de *T. gondii* por 24h e a porcentagem de proliferação intracelular de parasitos foi medida pelo ensaio de β -galactosidase, no qual o não tratado/infectado (grupo controle) foi considerado como 100% de proliferação parasitária. Foram realizados três experimentos independentes em octuplicata. *Comparação entre lactose/controle.

5.5. A inibição da expressão de Gal-3 em vilos placentários mediada por GB1107 contribuiu para o aumento da proliferação de *T. gondii* possivelmente através da redução dos níveis de MIF e IL6

A viabilidade dos vilos placentários foi avaliada após tratamento por 24h com GB1107, ou após a sua remoção por mais 24h, utilizando o ensaio MTT. Observamos que durante as primeiras 24h de tratamento, houve toxicidade para o explante apenas na concentração de 180 μ M (*P=0,0087) e que continuou tóxica mesmo após a remoção do tratamento, mostrando-se irreversível (^SP<0,0001), em comparação com os respectivos controles (grupos incubados apenas com meio de cultura); a concentração de 150 μ M se mostrou tóxica apenas na condição de remoção quando comparado ao controle não tratado, sugerindo que essa ainda seja uma dose elevada e que seu resquício causa prejuízos para o tecido (^SP=0,0008). Assim, em ambas as condições experimentais analisadas, observamos que apenas a menor concentração utilizada (120 μ M) não alterou a viabilidade tecidual comparado ao grupo controle (vilos não tratados) (**Figura 5A**). Confirmando o nosso ensaio de viabilidade por MTT, o ensaio LDH também revelou que durante as primeiras 24h de tratamento, houve toxicidade para o explante nas concentrações de 180 μ M (*P<0,0001) e 150 μ M (*P<0,0001) e que a toxicidade permaneceu mesmo após a remoção do tratamento, mostrando-se irreversível (180 μ M ^SP<0,0001; 150 μ M ^SP=0,0085). O inibidor sintético não foi tóxico para os vilos placentários apenas na menor concentração de uso (120 μ M) em ambas as condições experimentais (tratamento ou remoção) em comparação com o grupo controle (**Figura 5B**). Além disso, a análise morfológica para a concentração de 120 μ M demonstrou a manutenção da integridade tecidual destacada por uma morfologia típica de células citotrofoblásticas (setas pretas) e mesênquima (M) em comparação com o grupo não tratado (**Figura 5 C-D**). Com base nesses resultados, promovemos o bloqueio de Gal-3 em vilos placentários utilizando concentrações seguras de inibidor e avaliamos inicialmente se nessa condição a proteína seria inibida. Confirmamos por Western blotting que 120 μ M é suficiente para inibir Gal-3, mesmo após a remoção do tratamento, evidenciando o seu efeito irreversível (**Figura 5E**). Posteriormente, após validarmos a inibição de Gal-3 dos vilos placentários mediada pelo GB1107, avaliamos a proliferação intracelular de *T. gondii*. Nossos dados demonstraram que a inibição da expressão de Gal-3 aumentou a proliferação parasitária quando comparado com os vilos placentários não tratadas (*P=0,0450) (**Figura 5F**).

Buscando compreender o impacto da inibição de Gal-3 mediada pelo tratamento com o inibidor na resposta imune, na presença ou ausência da infecção, mensuramos os níveis de citocinas no sobrenadante dos vilos placentários. Observamos que a infecção por *T. gondii*

aumentou os níveis de MIF em vilos não tratados ($*P = 0,0284$) em comparação com o controle não infectado. Curiosamente, os vilos infectados que receberam o inibidor, tiveram menor produção de MIF do que vilos infectados não tratados ($#P=0,0339$) (**Figura 5G**). A redução da expressão de Gal-3 induziu ao aumento nos níveis de IL6 em comparação com vilos não tratados ($^{\$}P=0,0020$). Contudo, durante a infecção por *T. gondii*, há uma regulação negativa de IL6 nos vilos tratados com inibidor em comparação com a condição não infectada ($^{\&}P=0,0009$) (**Figura 5H**). Em relação à produção de IL10, nossos dados revelaram que os vilos não infectados e tratados com inibidor reduziram a produção de IL10 ($^{\$}P=0,0020$) em comparação ao controle. Além disso, vilos infectados e não tratados também apresentaram uma redução na secreção desta citocina quando comparado ao controle não infectado ($*P=0,0153$) (**Figura 5I**). Por outro lado, os níveis de TNF α não apresentaram diferença estatística em nenhuma condição experimental (**Figura 5J**).

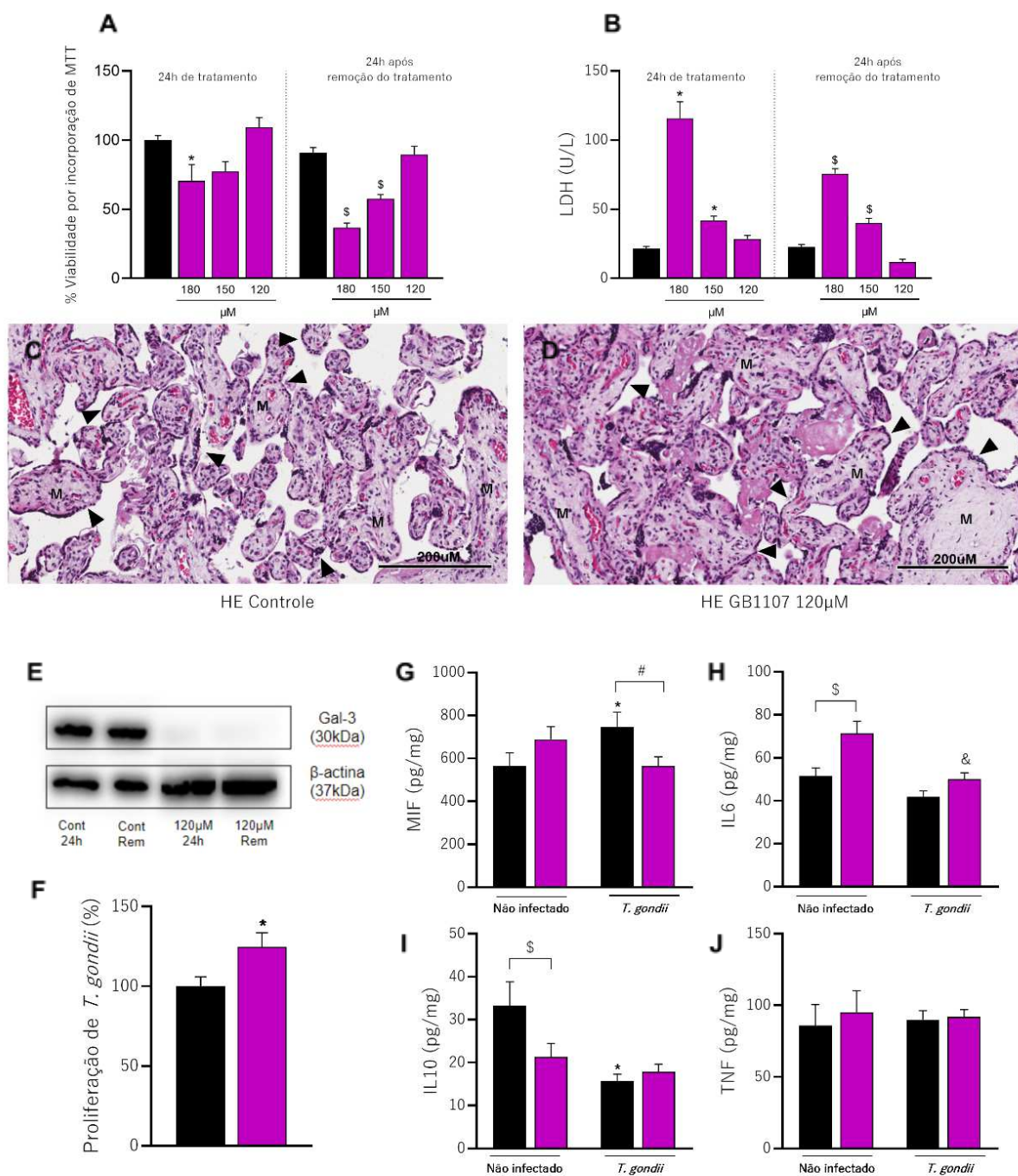


Figura 5. O tratamento com inibidor sintético (GB1107) não afeta a viabilidade dos vilos placentários e aumenta o parasitismo. Os vilos placentários foram incubados por 24h com inibidor para bloquear Gal-3 (180, 150, 120 μ M) e posteriormente o tratamento foi removido e adicionado apenas meio de cultura por mais 24h e submetidos à análise de viabilidade. (A) A viabilidade dos vilos placentários foi determinada pela incorporação de MTT, o grupo controle considerou 100% da viabilidade (B) Os sobrenadantes dos vilos placentários foram coletados e usados para medir os níveis de LDH (U/L). Foram realizados dois experimentos independentes em octuplicata. *Comparação entre GB1107/controlado na condição tratada por 24h; ^sComparação entre GB1107/controlado na condição após a remoção do tratamento. São mostradas fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) de vilos placentários tratadas com (C) meio de cultura ou (D) inibidor (120 μ M) por 24h. As fotomicrografias foram capturadas com ampliação de 40x (barra de escala:

60 μ m). (E) Vilos placentários previamente incubados com inibidor (120uM) e foram infectados com taquizoítas de *T. gondii* por 24h e a porcentagem de proliferação intracelular de parasitos foi medida pelo ensaio de β -galactosidase, no qual o não tratado/infectado (grupo controle) foi considerado como 100% de proliferação parasitária. Foram realizados três experimentos independentes em octoplicata. *Comparação entre GB1107/controle. Adicionalmente, vilos placentários foram infectadas ou não com taquizoítas de *T. gondii*, os sobrenadantes da cultura celular foram coletados para medição de (F) MIF, (G) IL6, (H) IL10 e (I) TNF α . *Comparação entre vilos não tratados infectados ou não; &Comparação entre vilos tratados com GB1107 infectados ou não; §Comparação entre vilos não infectados; #Comparação entre vilos infectados.

6. DISCUSSÃO

Gal-3 é uma lectina multifuncional de ligação a β -galactosídeo associada à implantação, embriogênese, formação placentária, bem como à manutenção e sucesso da gravidez (Yang et al., 2011; Yang; Lei; Zhang, 2013). Curiosamente, foi relatado que Gal-3 desempenha uma participação proeminente durante infecções por parasitos protozoários, incluindo *T. gondii* (Debierre-Grockiego et al., 2010; Alves et al., 2010). Neste cenário, investigamos de forma pioneira o papel da Gal-3 durante a infecção por *T. gondii* através de dois modelos experimentais bem estabelecidos de interface materno-fetal: um modelo *in vitro* utilizando células trofoblásticas humanas (células BeWo) e um modelo *ex vivo* usando vilos placentários do terceiro trimestre de gravidez (Costa et al., 2020; Rosini et al., 2021; Martínez et al., 2023; Teixeira et al., 2023).

Para desvendar se Gal-3 é capaz de modular etapas essenciais do ciclo lítico de *T. gondii*, avaliamos os processos de adesão, invasão e proliferação. Nossos dados revelaram que a expressão reduzida de Gal-3 em células BeWo favoreceu a infecção parasitária, o que foi destacado por maiores taxas de invasão e proliferação intracelular, assim como em vilos placentários tratados com inibidor sintético GB1107 onde a proliferação do parasito também aumentou, indicando que esta lectina desempenha um papel importante no controle do parasitismo. Corroborando com nossos dados, Bernardes e colegas (2006) demonstraram que a infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* em camundongos Gal-3^{-/-} exibiu maior carga parasitária (Bernardes et al., 2006). Diante do exposto, os resultados encontrados neste estudo corroboram os da literatura, uma vez que em células BeWo com expressão reduzida de Gal-3, bem como em vilosidades placentárias tratadas com inibidor, houve aumento da invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*, sugerindo que esta lectina desempenha um papel importante no controle da infecção pelo parasito na interface materno-fetal.

Então, nossas descobertas demonstraram que a expressão reduzida de Gal-3 aumentou a suscetibilidade das células BeWo e de vilos placentários tratados com inibidor sintético à infecção por *T. gondii*. Assim, levantou-se a seguinte questão: seria a deficiência da expressão de Gal-3 capaz de modular a expressão de mediadores imunológicos importantes no controle do parasitismo?

A literatura já demonstrou a importância de Gal-3 na resposta imunológica contra *T. gondii* e outros parasitos. Foi demonstrado que Gal-3 expressa em macrófagos reconhece glicosilfosfatidilinosítóis (GPIs) na superfície de *T. gondii*, uma interação necessária para gerar uma resposta imune antiparasitária eficaz (Debierre-Grockiego et al., 2010). A ligação

da Gal-3 aos GPIs de *T. gondii* aumenta os níveis de TNF- α nos macrófagos infectados e, paralelamente, a Gal-3 também pode atuar como um co-receptor, apresentando os GPIs aos receptores do tipo toll (TLRs) nos macrófagos (Debierre-Grockiego et al., 2010). Após infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, camundongos Gal-3^{-/-} exibiram maior carga parasitária, diminuição do recrutamento de monócitos/macrófagos e neutrófilos, atraso na resposta inflamatória no sistema nervoso central e concentrações significativamente mais altas de IL12 e IFN γ no soro em comparação com camundongos Gal-3^{+/+}, sugerindo que Gal-3 é uma molécula importante no curso de uma resposta imune para controlar a proliferação de *T. gondii* *in vivo* (Bernardes et al., 2006).

Em relação a outros parasitos protozoários, a literatura revelou que Gal-3 reconhece glicoproteínas e glicolipídios expressos na superfície de patógenos como *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (Pelletier; Sato, 2002; Van Den Berg et al., 2004; Pineda et al., 2015). Gal-3 é responsável por reconhecer o lipofosfoglicano presente na superfície de *L. major*, sugerindo que a molécula pode contribuir para uma resposta imune específica contra a leishmaniose (Van Den Berg et al., 2004). Outro estudo demonstrou que Gal-3 reconhece glicanos presentes em *S. mansoni*, o que pode ser um padrão para o reconhecimento imunológico do parasito mediado por esta galectina (Pineda et al., 2015). Além disso, esta molécula parece ser importante no controle de *T. cruzi* que, ao evadir dos mecanismos imunológicos desencadeados pela Gal-3 durante a infecção, altera a estrutura molecular da galectina, anulando assim os mecanismos de sinalização associados à imunidade inata que são desencadeados por esta lectina (Pineda et al., 2015, 2020).

Assim, avaliamos os efeitos imunomoduladores de Gal-3 mensurando os níveis de citocinas presentes nos sobrenadantes de células BeWo Wild Type, shGal-3 e vilos placentários (pré-tratados com o inibidor GB1107) infectados ou não por *T. gondii*. Em geral, observamos que a modulação negativa de Gal-3 reduziu os níveis de IL-6 e IFN- γ em células BeWo não infectadas. Da mesma forma, a expressão reduzida de Gal-3 também prejudicou a produção de MIF e IL-6 em células BeWo infectadas por *T. gondii*. Além disso, a ausência de Gal-3 parece não interferir na produção de IL-8 em células BeWo infectadas ou não. Adicionalmente, notamos que a redução de Gal-3 pelo inibidor sintético em vilos placentários também prejudicou a produção de MIF e IL-6 nas condições infectadas.

No contexto da interface materno-fetal, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa relataram extensivamente o papel da IL-6, MIF e IFN- γ durante a infecção por *T. gondii* (Rosini et al., 2022; Fernandes et al., 2023; Teixeira et al., 2023). Foi demonstrado que níveis mais elevados de MIF em células BeWo e em vilos placentários infectadas por *T. gondii* estão

associados ao controle do parasitismo (Ferro et al., 2008; Franco et al., 2011; Gomes et al., 2011). De maneira semelhante, a IL-6 desempenha um papel importante durante a invasão e implantação do embrião no útero (Champion et al., 2012). e está envolvida no controle de infecções por parasitos intracelulares, especialmente *T. gondii* (Barbosa et al., 2015; Da Silva et al., 2017; Gomes et al., 2018; Fernandes et al., 2023; Teixeira et al., 2023). Por outro lado, apesar de sua grande importância durante a infecção aguda por *T. gondii* (Liu; Huang; Lu, 2018), foi demonstrado que o IFN γ não é capaz de controlar o parasitismo em células BeWo (Oliveira et al., 2006; Barbosa et al., 2008; Barbosa et al., 2015). Em conjunto, demonstramos que os baixos níveis de IL-6 e MIF nas células shGal-3 BeWo e nos vilos placentários tratados com inibidor, poderiam ser responsáveis pelo comprometimento da invasão e proliferação de *T. gondii*, como descrito anteriormente em modelos distintos na interface materno-fetal (Fernandes et al., 2023; Teixeira et al., 2023). Nossos achados indicam que a deficiência na expressão de Gal-3 está associada a modulação negativa da produção de citocinas essenciais para o controle do parasitismo, destacando assim, que Gal-3 tem papel chave na regulação da resposta imune contra *T. gondii* na interface materno-fetal.

Adicionalmente, avaliamos o papel da Gal-3 durante a infecção por *T. gondii* usando os vilos placentários no terceiro trimestre tratados com β -lactose, um composto que inibe eficientemente os domínios N-terminal e C-terminal bloqueando os domínios Gal-3 (Sano et al., 2000; Fernández et al., 2005; Stowell et al., 2008). Curiosamente, doses não citotóxicas de β -lactose controlaram a proliferação intracelular de *T. gondii* em vilos placentários de maneira dose-dependente, ao contrário dos resultados observados em células BeWo com expressão reduzida de Gal-3 e em vilos tratados com inibidor. Acreditamos que esse resultado possa estar relacionado à inespecificidade da lactose para o sítio Gal-3, o que poderia estar desencadeando outras vias de sinalização intracelular que contribuem para o controle do parasitismo.

Além disso, as variações nos resultados observadas entre os diferentes modelos empregados nesta pesquisa destacam a importância da utilização de abordagens *in vitro* e *ex vivo* para investigar a interface materno-fetal em humanos (Rosini et al., 2022; de Souza et al., 2023). Embora o estudo de células isoladas seja crucial para decifrar mecanismos celulares específicos, o emprego da placenta humana é essencial devido à sua representação mais abrangente do ambiente placentário. Este tecido abrange não apenas trofoblastos vilosos, mas também trofoblastos extravilosos, sinciciotrofoblastos, mesênquima e vasos sanguíneos fetais (Turco, 2019). Consequentemente, o microambiente dos explantes placentários difere significativamente daquele dos trofoblastos isolados individuais.

7. CONCLUSÃO

Nossos achados demonstram que a Gal-3 é uma proteína crucial para o controle da infecção por *T. gondii*, visto que a deficiência em sua expressão resulta em um aumento nas taxas de invasão e proliferação do parasita. Além disso, a ausência de Gal-3 está associada à modulação negativa de MIF e IL-6, citocinas importantes para o controle da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal.

Este é o primeiro estudo que revela o papel da Gal-3 na infecção por *T. gondii* no contexto gestacional. Nesse sentido, são necessários novos estudos que utilizem outros modelos e investiguem os mecanismos pelos quais essa lectina atua no microambiente placentário, para que possamos entender completamente sua função no controle da transmissão vertical do parasita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN, Lepczyk C, Lilly EL, McLeod R, Milcarsky J, Murphy CE, Su C, VanWormer E, Yolken R, Sizemore GC. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. **Ecohealth**. 2019 Jun;16(2):378-390.

Alves CM, Silva DA, Azzolini AE, Marzocchi-Machado CM, Carvalho JV, Pajuaba AC, Lucisano-Valim YM, Chammas R, Liu FT, Roque-Barreira MC, Mineo JR. Galectin-3 plays a modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. **Immunobiology**. 2010 Jun;215(6):475-85.

Alves CM, Silva DA, Azzolini AE, Marzocchi-Machado CM, Lucisano-Valim YM, Roque-Barreira MC, Mineo JR. Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. 2013 Feb;140(2):210-9.

Aplin JD, Myers JE, Timms K, Westwood M. Tracking placental development in health and disease. **Nat Rev Endocrinol**. 2020 Sep;16(9):479-494.

Arranz-Solís D, Mukhopadhyay D, Saeij JJP. Toxoplasma Effectors that Affect Pregnancy Outcome. **Trends Parasitol**. 2021 Apr;37(4):283-295.

Barbosa BF, Lopes-Maria JB, Gomes AO, Angeloni MB, Castro AS, Franco PS, Fermino ML, Roque-Barreira MC, Ietta F, Martins-Filho OA, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biol Reprod**. 2015 Mar;92(3):82.

Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **Am J Pathol**. 2006 Jun;168(6):1910-20.

Bigna JJ, Tochie JN, Tounouga DN, Bekolo AO, Ymele NS, Simé PS, Nansseu JR. Global, regional and national estimates of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pregnant women: a protocol for a systematic review and modelling analysis. **BMJ Open**. 2019 Oct 19;9(10):e030472.

Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annu Rev Microbiol**. 2015;69:463-85.

Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**. 2009 May;117(5-6):458-76.

- Blois SM, Conrad ML, Freitag N, Barrientos G. Galectins in angiogenesis: consequences for gestation. **J Reprod Immunol**. 2015 Apr;108:33-41.
- Bojić-Trbojević Ž, Jovanović Krivokuća M, Vilotić A, Kolundžić N, Stefanoska I, Zetterberg F, Nilsson UJ, Leffler H, Vićovac L. Human trophoblast requires galectin-3 for cell migration and invasion. *Sci Rep*. 2019 Feb 14;9(1):2136.
- Bolais PF, Vignoles P, Pereira PF, Keim R, Aroussi A, Ismail K, Dardé ML, Amendoeira MR, Mercier A. *Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. **Parasit Vectors**. 2017 Feb;17;10(1):88.
- Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. **Mediators Inflamm**. 2018 May;21;2018:9186940.
- Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. **Placenta**. 2007 Apr;28 Suppl A:S64-9.
- Butcher BA, Greene RI, Henry SC, Annecharico KL, Weinberg JB, Denkers EY, Sher A, Taylor GA. p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages. **Infect Immun**. 2005 Jun;73(6):3278-86.
- Chain MO, Paiva CAM, Maciel IO, Neto AN, Castro VF, Oliveira CP, Mendonça BDS, Nestal de Moraes G, Reis SAD, Carvalho MA, De-Melo LDB. Galectin-3 mediates survival and apoptosis pathways during *Trypanosoma cruzi*-host cell interplay. **Exp Parasitol**. 2020 Sep;216:107932.
- Chen JZ, Sheehan PM, Brennecke SP, Keogh RJ. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. **Mol Cell Endocrinol**. 2012 Feb;26;349(2):138-44.
- Chou FC, Chen HY, Kuo CC, Sytwu HK. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. **Int J Mol Sci**. 2018 Feb;19(2):430.
- Costa IN, Ribeiro M, Silva Franco P, da Silva RJ, de Araújo TE, Milián ICB, Luz LC, Guirelli PM, Nakazato G, Mineo JR, Mineo TWP, Barbosa BF, Ferro EAV. Biogenic Silver Nanoparticles Can Control *Toxoplasma gondii* Infection in Both Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Front Microbiol**. 2021 Jan;21;11:623947.
- da Silva RJ, Gomes AO, Franco PS, Pereira AS, Milian ICB, Ribeiro M, Fiorenzani P, Dos Santos MC, Mineo JR, da Silva NM, Ferro EAV, de Freitas Barbosa B. Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from Human Third Trimester Pregnancy. **Front Cell Infect Microbiol**. 2017 Jul 26;7:340.

de Melo Fernandes TA, Teixeira SC, Costa TR, Rosini AM, de Souza G, Polloni L, Barbosa BF, Silva MJB, Ferro EAV, Ávila VMR. BjusLAAO-II, an l-amino acid oxidase from Bothrops jararacussu snake venom, impairs *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and villous explants from the third trimester of pregnancy. **Microbes Infect.** 2023 Jul-Aug;25(6):105123.

de Souza G, Silva RJ, Milián ICB, Rosini AM, de Araújo TE, Teixeira SC, Oliveira MC, Franco PS, da Silva CV, Mineo JR, Silva NM, Ferro EAV, Barbosa BF. Cyclooxygenase (COX)-2 modulates *Toxoplasma gondii* infection, immune response and lipid droplets formation in human trophoblast cells and villous explants. **Sci Rep.** 2021 Jun;16;11(1):12709.

Debierre-Grockieo F, Niehus S, Coddeville B, Ellass E, Poirier F, Weingart R, Schmidt RR, Mazurier J, Guérardel Y, Schwarz RT. Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. **J Biol Chem.** 2010 Oct 22;285(43):32744-32750.

Dubey JP, Hotea I, Olariu TR, Jones JL, Dărăbuș G. Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. **Parasitology.** 2014 Mar;141(3):311-25.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology.** 2012 Sep;139(11):1375-424.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol.** 2010 Apr;26(4):190-6.

Fallahi S, Rostami A, Nourollahpour Shiadeh M, Behniafar H, Paktinat S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **J Gynecol Obstet Hum Reprod.** 2018 Mar;47(3):133-140.

Fernández GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gómez SA, Beigier Bompadre M, Isturiz MA, Rabinovich GA, Palermo MS. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. **Glycobiology.** 2005 May;15(5):519-27.

Freitag N, Tirado-González I, Barrientos G, Cohen M, Daher S, Goldman-Wohl D, Mincheva-Nilsson L, John CM, Jeschke U, Blois SM. The chimera-type galectin-3 is a positive modulator of trophoblast functions with dysregulated expression in gestational diabetes mellitus. **Am J Reprod Immunol.** 2020 Dec;84(6):e13311.

Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Barrientos G, Powell KL, Boehm-Sturm P, Koch SP, Hecher K, Staff AC, Arck PC, Diemert A, Blois SM. Galectin-3 deficiency in pregnancy increases the

risk of fetal growth restriction (FGR) via placental insufficiency. **Cell Death Dis.** 2020 Jul;23;11(7):560.

Gamliel M, Goldman-Wohl D, Isaacson B, Gur C, Stein N, Yamin R, Berger M, Grunewald M, Keshet E, Rais Y, Bornstein C, David E, Jelinski A, Eisenberg I, Greenfield C, Ben-David A, Imbar T, Gilad R, Haimov-Kochman R, Mankuta D, Elami-Suzin M, Amit I, Hanna JH, Yagel S, Mandelboim O. Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. **Immunity.** 2018 May;15;48(5):951-962.e5.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.** 1994 Sep;15;153(6):2533-43.

Gómez-Chávez F, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, Flores-García Y, Figueroa-Damián R, Luna-Pastén H, Gómez-Toscano V, López-Candiani C, Arce-Estrada GE, Bonilla-Ríos CA, Mora-González JC, García-Ruiz R, Correa D. A Proinflammatory Immune Response Might Determine *Toxoplasma gondii* Vertical Transmission and Severity of Clinical Features in Congenitally Infected Newborns. **Front Immunol.** 2020 Mar;13;11:390.

Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. **Thromb Res.** 2004;114(5-6):397-407.

Hutter S, Knabl J, Andergassen U, Hofmann S, Kuhn C, Mahner S, Arck P, Jeschke U. Placental Expression Patterns of Galectin-1, Galectin-2, Galectin-3 and Galectin-13 in Cases of Intrauterine Growth Restriction (IUGR). **Int J Mol Sci.** 2016 Apr;7;17(4):523.

Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses Public Health.** 2010 Feb;57(1):1-7.

Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan WJ Jr. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Cell Mol Life Sci.** 2018 Jul;75(13):2355-2373.

Kim SM, Kim JS. A Review of Mechanisms of Implantation. **Dev Reprod.** 2017 Dec;21(4):351-359.

Knöfler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. **Int J Dev Biol.** 2010;54(2-3):269-80.

Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cell Mol Life Sci.** 2019 Sep;76(18):3479-3496.

Koga K, Aldo PB, Mor G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. **J Obstet Gynaecol Res.** 2009 Apr;35(2):191-202.

Laliberté J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cell Mol Life Sci**. 2008 Jun;65(12):1900-15.

Lambert H, Barragan A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cell Microbiol**. 2010 Mar;12(3):292-300.

Lang C, Gross U, Lüder CG. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**. 2007 Jan;100(2):191-203.

Lim SSY, Chua KH, Nölke G, Spiegel H, Goh WL, Chow SC, Kee BP, Fischer R, Schillberg S, Othman RY. Plant-derived chimeric antibodies inhibit the invasion of human fibroblasts by *Toxoplasma gondii*. **PeerJ**. 2018 Dec;11;6:e5780.

Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Ann N Y Acad Sci**. 2010 Jan;1183:158-82.

Liu J, Huang S, Lu F. Galectin-3 and Galectin-9 May Differently Regulate the Expressions of Microglial M1/M2 Markers and T Helper 1/Th2 Cytokines in the Brains of Genetically Susceptible C57BL/6 and Resistant BALB/c Mice Following Peroral Infection With *Toxoplasma gondii*. **Front Immunol**. 2018 Jul 31;9:1648.

Maquoi E, van den Brûle FA, Castronovo V, Foidart JM. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. **Placenta**. 1997 Jul-Aug;18(5-6):433-9.

Martínez AFF, Teixeira SC, de Souza G, Rosini AM, Júnior JPL, Melo GN, Blandón KOE, Gomes AO, Ambrósio SR, Veneziani RCS, Bastos JK, Martins CHG, Ferro EAV, Barbosa BF. Leaf hydroalcoholic extract and oleoresin from *Copaifera multijuga* control *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and placental explants from third-trimester pregnancy. **Front Cell Infect Microbiol**. 2023 Feb 13;13:1113896.

Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**. 2009 Jan;39(1):23-39.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. **Lancet**. 2004 Jun;12;363(9425):1965-76.

Nio-Kobayashi J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. **Anat Sci Int**. 2017 Jan;92(1):25-36.

Oliveira RM, Teixeira TL, Rodrigues CC, da Silva AA, Borges BC, Brígido RTS, Teixeira SC, Dos Santos MA, Servato JPS, de O Santos D, Silva MJB, Goulart LR, da Silva CV. Galectin-3 plays a protective role in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Glycobiology**. 2021 Nov;18;31(10):1378-1389.

Pattillo RA, Gey GO. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. **Cancer Res.** 1968 Jul;28(7):1231-6.

Pfefferkorn ER, Rebhun S, Eckel M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **J Interferon Res.** 1986 Jun;6(3):267-79.

Pineda M, Corvo L, Callejas-Hernández F, Fresno M, Bonay P. *Trypanosoma cruzi* cleaves galectin-3 N-terminal domain to suppress its innate microbicidal activity. **Clin Exp Immunol.** 2020 Feb;199(2):216-229.

Pollheimer J, Knöfler M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. **Wien Med Wochenschr.** 2012 May;162(9-10):187-90.

Prossler J, Chen Q, Chamley L, James JL. The relationship between TGF β , low oxygen and the outgrowth of extravillous trophoblasts from anchoring villi during the first trimester of pregnancy. **Cytokine.** 2014 Jul;68(1):9-15.

Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nat Rev Immunol.** 2009 May;9(5):338-52.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. **Adv Drug Deliv Rev.** 2009 Jul;25;61(9):746-59.

Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev.** 2012 Apr;25(2):264-96.

Rorman E, Zamir CS, Rilkis I, Ben-David H. Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod Toxicol.** 2006 May;21(4):458-72.

Rosini AM, Teixeira SC, Milian ICB, Silva RJ, de Souza G, Luz LC, Gomes AO, Mineo JR, Mineo TWP, Ferro EAV, Barbosa BF. LPS-mediated activation of TLR4 controls *Toxoplasma gondii* growth in human trophoblast cell (BeWo) and human villous explants in a dependent-manner of TRIF, MyD88, NF- κ B and cytokines. **Tissue Cell.** 2022 Oct;78:101907.

Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J Immunol.** 2000 Aug 15;165(4):2156-64.

Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunol Rev.** 2009 Jul;230(1):172-87.

Schminkey DL, Groer M. Imitating a stress response: a new hypothesis about the innate immune system's role in pregnancy. **Med Hypotheses**. 2014 Jun;82(6):721-9.

Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, Bellotti C, Salehi LB, Ricci A. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. **Int J Mol Sci**. 2018 Jan 26;19(2):379.

Shan G. RNA interference as a gene knockdown technique. **Int J Biochem Cell Biol**. 2010 Aug;42(8):1243-51.

Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **J Immunol**. 2008 Mar 1;180(5):3091-102.

Strang AGGF, Ferrari RG, do Rosário DK, Nishi L, Evangelista FF, Santana PL, de Souza AH, Mantelo FM, Guilherme ALF. The congenital toxoplasmosis burden in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Acta Trop**. 2020 Nov;211:105608.

Svensson-Arvelund J, Ernerudh J. The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface. **Am J Reprod Immunol**. 2015 Aug;74(2):100-9.

Tardieux I, Baum J. Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. **J Cell Biol**. 2016 Aug 29;214(5):507-15.

Teixeira SC, de Souza G, Borges BC, de Araújo TE, Rosini AM, Aguila FA, Ambrósio SR, Veneziani RCS, Bastos JK, Silva MJB, Martins CHG, de Freitas Barbosa B, Ferro EAV. *Copaifera* spp. oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. **Sci Rep**. 2020 Sep 16;10(1):15158.

Teixeira SC, Paschoalino M, de Souza G, Rosini AM, de Lima Junior JP, Luz LC, Fajardo Martínez AF, Alves RN, Almeida MPO, Damasceno JL, Silva MJB, Ietta F, Barbosa BF, Ferro EAV, Gomes Martins CH. Rottlerin impairs early and late steps of *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and villous explants. **Chem Biol Interact**. 2023 Oct 1;384:110716.

Teixeira SC, Rosini AM, de Souza G, Martínez AF, Silva RJ, Ambrósio SR, Veneziani RC, Bastos JK, Martins CH, Barbosa BF, Ferro EA. Polyalthic acid and oleoresin from *Copaifera trapezifolia* Hayne reduce *Toxoplasma gondii* growth in human villous explants, even triggering an anti-inflammatory profile. **Exp Parasitol**. 2023 Jul;250:108534.

Teixeira SC, Silva RJ, Lopes-Maria JB, Gomes AO, Angeloni MB, Fermino ML, Roque-Barreira MC, Silva NM, Silva DAO, Mineo JR, Ferro EAV, Barbosa BF. Transforming growth factor (TGF)- β 1 and interferon (IFN)- γ differentially regulate ICAM-1 expression and adhesion of *Toxoplasma gondii* to human trophoblast (BeWo) and uterine cervical (HeLa)

cells. **Acta Trop.** 2021 Dec;224:106111.

Torrey EF, Yolken RH. Toxoplasma oocysts as a public health problem. **Trends Parasitol.** 2013 Aug;29(8):380-4.

Vuong L, Kouverianou E, Rooney CM, McHugh BJ, Howie SEM, Gregory CD, Forbes SJ, Henderson NC, Zetterberg FR, Nilsson UJ, Leffler H, Ford P, Pedersen A, Gravelle L, Tantawi S, Schambye H, Sethi T, MacKinnon AC. An Orally Active Galectin-3 Antagonist Inhibits Lung Adenocarcinoma Growth and Augments Response to PD-L1 Blockade. **Cancer Res.** 2019 Apr 1;79(7):1480-1492.

Wille U, Villegas EN, Striepen B, Roos DS, Hunter CA. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.** 2001 Jun;23(6):291-6.

Wolfe MW. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. **Methods Mol Med.** 2006;121:229-39.

Wu ZM, Yang H, Li M, Yeh CC, Schatz F, Lockwood CJ, Di W, Huang SJ. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. **Placenta.** 2012 Mar;33(3):188-94.

Xiao Q, Zeng FL, Tang GY, Lei CY, Zou XX, Liu XL, Peng BL, Qin S, Li HX. Expression of galectin-3 and apoptosis in placental villi from patients with missed abortion during early pregnancy. **Exp Ther Med.** 2019 Apr;17(4):2623-2631.

Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. **Front Immunol.** 2019 Oct 18;10:2317.

Yang H, Lei CX, Zhang W. Human chorionic gonadotropin (hCG) regulation of galectin-3 expression in endometrial epithelial cells and endometrial stromal cells. **Acta Histochem.** 2013 Jan;115(1):3-7.

Yang H, Taylor HS, Lei C, Cheng C, Zhang W. Hormonal regulation of galectin 3 in trophoblasts and its effects on endometrium. **Reprod Sci.** 2011 Nov;18(11):1118-27.

Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol.** 2014 Feb;14(2):109-21.

Zetterberg FR, Peterson K, Johnsson RE, Brimert T, Håkansson M, Logan DT, Leffler H, Nilsson UJ. Monosaccharide Derivatives with Low-Nanomolar Lectin Affinity and High Selectivity Based on Combined Fluorine-Amide, Phenyl-Arginine, Sulfur- π , and Halogen Bond Interactions. **ChemMedChem.** 2018 Jan;22;13(2):133-137.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP/UFU
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –
Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG – CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;
e-mail: cep@propp.ufu.br ; www.comissoes.propp.ufu.br

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS
COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS COMUNICA QUE AS PESQUISAS CUJOS DADOS SERÃO OBTIDOS EXCLUSIVAMENTE COM O USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE NÃO NECESSITAM DE ANÁLISE ÉTICA POR UM CEP.

EXEMPLOS DESSAS CÉLULAS: HeLa; BeWo; JEG-3; HTR-8; HFF; Caco-2.

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU