UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da participação de Gal-1 e Gal-4 na evolução da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

ANNA KAROLINE AGUIAR FLEURI

Ribeirão Preto, 2019.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Avaliação da participação de Gal-1 e Gal-4 na evolução da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

ANNA KAROLINE AGUIAR FLEURI

Ribeirão Preto, 2019.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da participação de Gal-1 e Gal-4 na evolução da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientado(a): Anna Karoline Aguiar Fleuri

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 21 de março de 2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto, 2019.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

FLEURI, Anna Karoline Aguiar

Avaliação da participação de Gal-1 e Gal-4 na evolução da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Ribeirão Preto, 2019.

151 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Marcelo Dias Baruffi.

1. Glicobiologia, 2. Imunorregulação, 3. *Leishmania*, 4. Lectina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: FLEURI, Anna Karoline Aguiar

Título: Avaliação da participação de Gal-1 e Gal-4 na evolução da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Trabalho realizado no Laboratório de Glicoimunologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas e associado ao Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai (in memorian), Divino Pereira Fleuri, e à minha mãe, Aparecida Aguiar de Andrade Fleuri, pelo amor incondicional e por terem batalhado junto a mim pela realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Marcelo Dias Baruffi pela orientação, pela oportunidade de desenvolver esse projeto e pela confiança depositada em mim e em meu trabalho. Agradeço pelo aprendizado e pelo exemplo de dedicação e amor à pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro com a bolsa de doutoradoo.

Ao Henrique e à Ana Lúcia, secretários do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, por sempre se mostrarem prestativos em ajudar e esclarecendo minhas dúvidas.

Aos professores Dr. Sérgio de Albuqurque, Dr. Emerson Bernardes Drª Leandra Ramalho e Drª Lúcia Faccioli pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e constante disponibilidade em ajudar. Um agradecimento especial à professora Leandra pelo axílio nas análises histopatológicas das lâminas de histologia e por sempre esclarecer as minhas dúvidas.

À Vani Maria Alves Côrrea, funcionária do Departamento de Biologia Celular da FMRP-USP, pelo auxílio na montagem e coloração das lâminas de histologia.

À Fabiana Rossetto Morais pelo auxílio técnico na citometria de fluxo e pelos momentos de descontração.

Á Dona Regina, funcionária da limpeza, e ao Reinaldo, Ronaldo e Fábio, funcionários do Biotério, os quais possibilitaram a boa qualidade desse trabalho. Em especial aos funcionários do biotério pelo auxílio na manutenção dos camundongos utilizados neste trabalho.

Ao Rubens Eduardo e à Lílian Cataldi pelo apoio técnico no laboratório.

Aos meus amigos do Laboratório de Glicobiologia: Fábio, Luisa, Martin, Talícia, Tálita, Thais Canassa, Thais Plepis e Thalita pelas contribuições científicas, pelas discussões sobre experimentos, pela ajuda, pelo companheirismo, pelas risadas e pela amizade de todos. Agradeço especialmente à Thalita pela amizade e pela constante disponibilidade em ajudar.

A todos os colegas do doutorado, em especial à Fabiana Zambuzi pela amizade, apoio e momentos agradáveis proporcionados.

Aos meus queridos pais, Aparecida e Divino (*in memorian*), pelo amor incondicional e por me proverem a melhor educação possível, mesmo nos momentos mais

difíceis, nunca falhando. Serei eternamente grata, espero um dia poder retribuir todo o bem que vocês me deram. Eu amo vocês!

Ao meu tio Marcelo e à minha avó por sempre me apoiarem nas minhas decisões e pelo apoio para eu continuar. Agradeço especialmente ao meu tio Marcelo, meu amigo e segundo pai, pela presença mesmo estando distante e pelo apoio de sempre em tudo.

Aos meus irmãos, Jaqueline e Mateus, por me aturarem nos momentos difíceis e pelos ótimos momentos juntos, mesmo à distância. Agradeço especialmente à Jaqueline, minha irmã, amiga e cúmplice, por sempre me fortalecer na realização dos meus sonhos. Amo-te demais e para sempre!

Ao meu noivo, Rafael, por me aturar de forma heroica em todos os momentos, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e por acreditar em mim. Você me faz sentir a pessoa mais especial desse mundo e sempre me motiva a perseguir os meus sonhos. Obrigada por ser o meu companheiro de vida e por ser essa pessoa tão grandiosa e bondosa. Eu amo você!

Aos meus sogros, Geraldo e Maria Isabel, pelo carinho e por serem a minha família aqui em Ribeirão Preto. Sempre dispostos a me ajudar das mais diversas formas possíveis. Obrigada por tudo.

À Mariana, minha cunhada e amiga, por ser essa pessoa maravilhosa e sorridente que traz alegria aos meus dias.

À minha querida amiga Thailyne, obrigada pela sincera amizade e pelo apoio em todas as minhas escolhas. Você tem me mostrado a cada dia que amizades permanecem mesmo a longas distâncias.

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas, Toxocológicas e Bromatológicas da FCFRP que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

A todos que contribuiram de alguma forma para que esse trabalho fosse concluído.

RESUMO

FLEURI, A. K. A. **Avaliação da participação de Gal-1 e Gal-4 na evolução da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** 2019. 152f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Esta doença parasitária é um grave problema de saúde pública, cuja incidência vem crescendo em várias partes do mundo e o seu combate demanda tratamentos farmacológicos mais eficazes e a oferta de vacina. Estudos mostram que a resolução dessa infecção é dependente de uma resposta imunológica homeostática do hospedeiro. No entanto, ainda existem muitas lacunas na compreensão de sua patogênese. O papel das galectinas, proteínas que reconhecem glicanas com motivos β-galactosídeos, tem sido descrito em várias doenças infecciosas. No entanto, existem poucos relatos sobre a participação de galectinas na leishmaniose. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das galectinas-1 e -4 na infecção experimental por *L. (L) amazonensis*. Nós demonstramos que a deficiência do gene da Gal-1 (Gal-1) em camundongos da linhagem BALB/c (BALB/c Lgals1$^{-/-}$), mas não em camundongos da linhagem C57BL/6, promoveu uma maior restrição da infecção por *L. (L.) amazonensis* em comparação com o respectivo camundongo selvagem (BALB/c *Lgals*$^{+/+}$). Este fenótipo de menor susceptibilidade foi caracterizado pelo aumento da produção de IFN-γ, diminuição de IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF-α, redução do tamanho da lesão e menor carga parasitária nos linfonodos drenantes. A Gal-1 não se ligou a *Leishmania*, sugerindo que a susceptibilidade à leishmaniose detectada nos camundongos BALB/c selvagens não foi devido a uma interação direta entre Gal-1 e *L. (L.) amazonensis*. Por outro lado, a Gal-4 completa, e não os seus domínios isolados, reconheceu *L. (L.) amazonensis* de modo sensível à lactose. Ainda, a Gal-4 reconheceu o lipofosfoglicano (LPG) purificado, um glicoconjugado expresso na superfície de celular de *Leishmania*, independentemente de seu polimorfismo estrutural intraespécie. O pré-tratamento de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4 não alterou a sua internalização por macrófagos obtidos de camundongos BALB/c Lgals$^{+/+}$ e favoreceu o controle de sua replicação por estes fagócitos. Curiosamente, a injeção intravenosa da forma radiomarcada da Gal-4 causou o acúmulo desta lectina no sítio de infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c *Lgals*$^{+/+}$. Este trabalho foi pioneiro em descrever a participação da Gal-1 e da Gal-4 na resposta imunológica contra *L. (L.) amazonensis* de modo independente ou dependente de sua interação direta com este parasito, respectivamente. Além disso, estes achados poderão contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e/ou diagnósticas aplicáveis a esta importante doença negligenciada.

Palavras-chave: Gal-1, Gal-4, *Leishmania*, Infecção, Imunorregulação

ABSTRACT

FLEURI, A. K. A. **Evaluation of the participation of Galectin-1 and Galectin-4 in the outcome of the experimental infection by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** 2019. 152f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Leishmaniasis is a neglected disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. This parasitic disease is a serious health problem with growing incidence in several parts of the world that demands more effective pharmacological treatments and the offer of vaccine in order to fight it. Studies have shown that the resolution of this infection is dependent of homeostatic immune response from the host. However, there are still many gaps in understanding its pathogenesis. The role of galectins, proteins that recognize glycans with beta-galactoside motifs, has been described in several infectious diseases. Nevertheless, there are few reports on the involvement of galectins in Leishmaniasis. The aim of this work is to evaluate the role of galectins 1 and 4 in experimental infection by *Leishmania* sp. We demonstrated that galectin-1 (Gal-1) deficiency in mice with the BALB/c background (Lgals1$^{-/-}$-BALB/c), whereas not in C57BL/6 mice, promotes better restriction of *L. (L.) amazonensis* infection compared to wild type BALB/c mice (Lgals1$^{+/+}$-BALB/c). This outcome was characterized by increased IFN-γ production, while decreased for other cytokines (IL-4, IL-10, IL-12p70, and TNF-α), decreased lesion size and parasite load at the draining lymph nodes. Gal-1 did not bind to the parasite, suggesting that the susceptibility to leishmaniasis detected in Lgals1$^{+/+}$-BALB/c mice was not due to a direct interaction between galectin-1 and *Leishmania*. On the other side, full length Gal-4, and not their isolated domains, recognizes *L. (L.) amazonensis* in lactose-sensitive manner. Furthermore, Gal-4 recognizes purified lipophosphoglycan (LPG), a glyconjugate expressed on the cell surface of *L. (L.) amazonensis*, independently of its intra-species structural polymorphism. The Gal-4 treatment of parasite cells did not change its internalization by non-Gal-1 deficient macrophages and favored the control of intracellular replication of the parasite compared to non-Gal-1 deficient macrophages. Curiously, the radiolabeled Gal-4 intravenous injection in infected Lgals1$^{+/+}$-BALB/c mice promotes great accumulation of this protein at the parasitic infection site. The data provides the first demonstration of galectin-4 and -1 in the immune response against *L. (L.) amazonensis* through direct parasite recognition or not, respectively. In addition, this work may open new approaches for therapeutic and/or diagnostic strategies applicable to this important neglected disease.

Keywords: Galectin-1, Galectin-4, *Leishmania*, Infection, Immunoregulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Situação epidemiológica mundial da LT.....4

Figura 2. Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da LT no Brasil.....6

Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.....7

Figura 4. Representação dos principais glicoconjugados presentes na superfície celular promastigotas de espécies de *Leishmania*.....12

Figura 5. Representação esquemática do LPG de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8.....14

Figura 6. Representação esquemática da classificação das Galectinas.....21

Figura 7. Cinética da evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$.....49

Figura 8. Carga parasitária da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$.....50

Figura 9. Estratégia de deleção do gene *LGALS1* em camundongos da linhagem BALB/c...52

Figura 10. Cinética da evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$.....54

Figura 11. Carga parasitária da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$.....55

Figura 12. Avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida em macrófagos de camundongos C57BL/6 deficientes ou não em Gal-1.....56

Figura 13. Avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida em macrófagos (BMDMs) de camundongos C57BL/6 deficientes ou não em Gal-1.....57

Figura 14. Avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida em macrófagos de camundongos BALB/c deficientes ou não em Gal-1.....58

Figura 15. Perfil histopatológico de orelha de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ na ausência de infecção.....59

Figura 16. Perfil histopatológico de orelha de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*.....61

Figura 17. Perfil histopatológico de linfonodo drenante de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ na ausência de infecção.....63

Figura 18. Perfil histopatológico de linfonodo drenante de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*.....64

Figura 19. Perfil de citocinas no sítio da infecção em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis*.....66

Figura 20. Perfil de citocinas no linfonodo drenante do sítio da infecção em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis*.....67

Figura 21. Confirmação da transformação bacteriana com o plasmídeo contendo o gene *LGALS4*.....69

Figura 22. Perfil cromatográfico da purificação de Gal-4 humana recombinante do extrato bruto de bactérias por cromatografia de afinidade e exclusão molecular.....71

Figura 23. Atividade hemaglutinante das preparações de Gal-4.....72

Figura 24. Perfil cromatográfico da purificação de Gal-1 humana recombinante do extrato bruto de bactérias por cromatografia de afinidade e exclusão molecular.....74

Figura 25. Atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1.....75

Figura 26. Gal-1 não se liga à superfície de *Leishmania* sp.....77

Figura 27. A forma íntegra da Gal-4, diferentemente de seus domínios isolados, interage com a superfície de *L. (L.) amazonensis*.....79

Figura 28. Gal-4 se liga à superfície de *L. (L.) amazonensis* e não altera a viabilidade do parasito.....82

Figura 29. Gal-4 promove aglutinação de *L. (L.) amazonensis* e alteração no aspecto morfológico de formas promastigotas.....83

Figura 30. Lipofosfoglicano de *L. (L.) amazonensis* é um alvo molecular de Gal-4.....85

Figura 31. O tratamento de macrófagos com Gal-4 exógena não altera a fagocitose de *L.(L.) amazonensis* em macrófagos BALB/c deficientes ou não em Gal-1.....87

Figura 32. O tratamento de *L.(L.) amazonensis* com Gal-4 exógena não altera a fagocitose deste parasito em macrófagos BALB/c deficientes ou não em Gal-1.....88

Figura 33. O tratamento de macrófagos com Gal-4 exógena não altera a multiplicação de *L.(L.) amazonensis* em macrófagos BALB/c deficientes ou não em Gal-1.....89

Figura 34. O tratamento de *L.(L.) amazonensis* com Gal-4 exógena favorece o controle da replicação do parasito em macrófagos BALB/c Lgas1$^{+/+}$.....90

Figura 35. Controle de qualidade de Gal-4-HYNIC-^{99m}Tc por HPLC analítico.....92

Figura 36. Gal-4 exógena é recrutada para o sítio da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*.....93

Figura 37. Esquema representativo da participação de Gal-1 e de Gal-4 no desenvolvimento da infecção experimental por *L. (L.) amazoensis*.....105

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Características dos oligonucleotídeos utilizados para deleção do gene *LGALS1*….30

Tabela 2. Cepas de *Leishmania* utilizadas no estudo.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anf. B	Anfotericina B
BMDM	Macrófago derivado de medula óssea
APC	Célula apresentadora de antígeno
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidrato
CT	Tomografia computadorizada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Gal	Galactose
Gal-1	Gal-1
Gal-3	Galectina-3
Gal-4	Gal-4
Gal-4-^{99m}Tc	Gal-4 radiomarcada
GIPL	Glicoinositolfosfolipídeos
Glc	Glicose
GlcN	N-acetilglucosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
gp63	Metaloprotease de 63 kDa
HIV	Vírus da imunideficiência humana
IFN-γ	Interferon γ
IL-1α	Interleucina-1α
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-12p70	Subunidade p70 da Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
IPTG	Isopropil β-D-tiogalacto-piranozídeo
JAK-STAT	Via de sinalização da Janus quinase - transdutor de sinal e ativação
L	Litro

LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCDf	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutaneomucosa
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmamiose tegumentar
LV	LV
M	Molar
Man	Manose
MCP-1	Proteína 1 quimioatraente de monócitos
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade 2
MIP-1	Proteína 1 inflamatória de macrófagos
mm	Milímetro
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
ng	Nanograma
NLR	Receptor do tipo NOD
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-10	Coluna de exclusão molecular
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
PG	Fosfoglicana extracelular
PO_4	Fosfato
PPG	Proteofosfoglicana
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
RNI	Intermediários reativos de nitrogênio

ROS	Radicais livres de oxigênio
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
sAP	Fosfatase ácida secretada
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
Th1	Célula T auxiliar do tipo 1
Th2	Célula T auxiliar do tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
µ	Micro
ºC	Graus Celsius
γ	Gama
™	Trademark
®	Marca registrada
+	Positivo
-	Negativo

Sumário

DEDICATÓRIA vii
AGRADECIMENTOS viii
RESUMO x
ABSTRACT xi
LISTA DE FIGURAS xii
LISTA DE TABELAS xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xvii
LISTA DE SÍMBOLOS xx
1. INTRODUÇÃO 2
1.1 As Leishmanioses 2
1.2 Epidemiologia das Leishmanioses 3
1.3 Agente etiológico da Leishmaniose e ciclo biológico do parasito 5
1.4 Manifestações clínicas das Leishmanioses 8
1.5 Glicoconjugados expressos na superfície celular de *Leishmania* sp. 10
1.6 Eventos iniciais para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* e resposta imunológica inata na Leishmaniose 14
1.8 Infecção experimental por *Leishmania*: modelo murino de infecção 17
1.9 As Galectinas 19
1.10 Modulação de respostas imunológicas e reconhecimento de patógenos por Galectinas 23
2. OBJETIVO 27
3. MATERIAIS E MÉTODOS 29
3.1 Camundongos 29
3.2 Obtenção dos camundongos BALB/c deficientes em Gal-1 29
3.3 Cultivo de espécies de *Leishmania* 30
3.4 Infecção experimental dos camundongos 31
3.5 Avaliação do desenvolvimento da lesão em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* 31
3.6 Quantificação da carga parasitária por diluição limitante 31
3.7 Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real (RT-PCR) 32
3.8 Análise histopatológica do sítio da infecção e linfonodo drenante 32

3.9 Dosagem de citocinas por ensaio de Milliplex® 33
3.10 Obtenção e purificação de Gal-1 recombinante humana 33
3.11 Obtenção e purificação de Gal-4 recombinante humana 34
3.12 PCR de colônia de bactéria *E. coli* produtora de Gal-4 humana recombinante 35
3.13 Identificação de Gal-4 por Western blot 36
3.14 Obtenção de Gal-1 e de Gal-4 humana recombinantes derivatizadas com isotiocianato de fluoresceína 37
3.15 Análise da atividade lectínica de Gal-1 e de Gal-4 recombinantes humana por ensaio de hemaglutinação 37
3.16 Marcação de Gal-4 com ^{99m}Tc 38
3.17 Avaliação da eficiência da radiomarcação de Gal-4hr-^{99m}Tc 38
3.18 Aquisição de imagens por micro SPECT/CT 39
3.19 Ensaio de ligação de Gal-1-FITC e Gal-4-FITC na superfície de espécies de *Leishmania* 39
3.19 Ensaio de ligação dos domínios isolados de Gal-4 na superfície de *L. (L.) amazonensis* 39
3.19 Avaliação da viabilidade de *L. (L.) amazonensis* após o tratamento com Gal-4 40
3.20 Avaliação morfológica de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com Gal-4 41
3.21 Extração e purificação de Lipofosfoglicana de *L. (L.) amazonensis* 41
3.22 Ensaio de ligação de Gal-4 à lipofosfoglicana de *L. (L.) amazonensis* 42
3.23 Preparo de macrófagos 43
3.23.1 Diferenciação de macrófagos a partir de precursores da medula óssea 43
3.23.2 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos elicitados por tioglicolato 43
3.24 Tratamento dos macrófagos com Gal-4 recombinante humana e infecção experimental 44
3.25 Tratamento de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4 recombinante humana e infecção experimental 45
3.26 Análise estatística 45
4. RESULTADOS 47
4.1 Efeito da deficiência de Gal-1 no desenvolvimento da infecção experimental em camundongos de fundo genético C57BL/6 47

4.2 Efeito da ausência de Gal-1 no desenvolvimento da infecção experimental em camundongos de fundo genético BALB/c 49
4.3 Efeito da deficiência de Gal-1 na restrição da infecção experimental em macrófagos 54
4.4 Análise histológica do sítio da infecção e de linfonodo drenante de camundongos BALB/c deficientes ou não em Gal-1 58
4.5 Análise do perfil de citocinas produzido após infecção com *L. (L.) amazonensis* no sítio da infecção e de linfonodo drenante de camundongos BALB/c deficientes ou não em Gal-1 63
4.6 Obtenção e purificação de Gal-4 humana recombinante 67
4.7 Obtenção e purificação de Gal-1 humana recombinante 72
4.8 Gal-1 humana recombinante não se liga à superfície de *Leishmania* sp. 74
4.9 Gal-4 humana recombinante se liga à superfície de *L. (L.) amazonensis* e não altera a viabilidade do parasito 76
4.10 Gal-4 humana recombinante reconhece Lipofosfoglicanos purificados de *L. (L.) amazonensis* 82
4.11 O tratamento de *L.(L.) amazonensis*, mas não o tratamento de macrófagos, com Gal-4 humana recombinante promove o controle da replicação do parasito em macrófagos BALB/c selvagens 84
4.12 A injeção intraperitoneal de Gal-4hr em camundongos BALB/c Lgas1$^{+/+}$ causa o seu acúmulo no sítio da infecção por *L. (L.) amazonensis* 89
5. DISCUSSÃO 93
6. DESTAQUES 100
7. CONCLUSÃO 103
8. REFERÊNCIAS 106

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). *Leishmania* é um modelo amplamente utilizado em estudos sobre parasitismo intracelular por protozoários. Os protozoários deste gênero são membros da família *Trypanosomatidae*, são organismos unicelulares que apresentam flagelo único e um cinetoplasto, que é uma região da mitocôndria rica em DNA (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). A doença apresenta distintas manifestações clínicas, podendo apresentar-se como uma lesão cutânea localizada com cura espontânea ou não, como no caso da Leishmanise Tegumentar (LT), a uma doença sistêmica generalizada que pode ser fatal, como no caso da Leishmaniose Visceral (LV). Apesar dos vários estudos que buscam compreender a complexa relação entre parasito e hospedeiro, a Leishmaniose ainda é uma doença negligenciada que representa um problema de saúde pública (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A forma tegumentar da Leishmaniose acompanha a humaninada desde a antiguidade. O parasito foi descrito pela primeira vez em 1903, pelo médico William Leishman e simultaneamente pelo pesquisador Charles Donovan em um caso de Calazar na Índia (ROSS, 1903), daí foi cunhado o nome do gênero *Leishmania*. No Brasil, a primeira observação do parasito ocorreu em 1895, quando Moreira identificou a presença de lesões cutâneas que foram denominadas Botão da Bahia ou Botão de Biskra. A existência de casos de LT no Brasil foi confirmada em 1909 por Lindenberg que encontrou formas do parasito do gênero *Leishmania* (BASANO; CAMARGO, 2004) em lesões cutâneas conhecidas como úlceras de Bauru em indivíduos que trabalhavam em matas do interior paulista. Gaspar Viana denominou o parasito encontrado no Brasil de *Leishmania braziliensis* por achá-lo diferente de *L. tropica*, parasito causador da LT no Velho Mundo (WRIGHT, 1903). Somente em 1922, Aragão demonstrou o papel do flebotomíneo na transmissão das Leishmanioses cutânea e mucocutânea. A LV possui uma história um pouco diferente. Em 1913 foi diagnosticado o primeiro caso pelo médico Migone em necropsia de um paciente do Estado do Mato Grosso. Somente em 1930 o inseto *Lutzomyia longipalpus* foi identificado como vetor (BRASIL, 2006). Neste momento, foram identificados os primeiros casos de Leishmaniose canina. Desde então, as Leishmanioses vêm sendo descritas em vários municípios de todas as unidades federativas do país.

1.2 Epidemiologia das Leishmanioses

A doença afeta principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, sendo associada à desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, sistema imunológico debilitado e falta de recursos. A Organização Mundial da Saúde, OMS (WHO, *World Health Organization*), estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. Em 2017, de 200 países e territórios que reportaram casos à OMS, 97 países e territórios foram endêmicos para leishmaniose. Nestes países que relataram casos, 65 são endêmicos tanto para LV como para LT, 10 países endêmicos para LV e 22 países endêmicos para apenas LT (WHO, 2016a, 2017a).

Desde 2013, o programa de Leishmaniose Global da OMS vem relatando separadamente o número de novos casos autóctones, para monitorar as tendências de incidência e o número de casos importados. Em 2016, 77% (58 países) dos países endêmicos para LV e 74% (64 países) dos países endêmicos para LT forneceram dados para a vigilância global. Mais de 90% dos casos globais de LV foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Os 10 países com o maior número de casos de LT reportados em 2016 foram: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos respondem por 84% da incidência global de LT relatada. O número de casos importados foi particularmente alto na Turquia, 1089 casos. Comparativamente, o número de casos importados de LV foi menor, com um total de 120 casos importados reportados globalmente em 2016. Dados recentes de outubro de 2018, 66% (50 países) dos países endêmicos para LV e 60% (52 países) dos países endêmicos para LT forneceram dados para a vigilância global da OMS. O foco do nosso estudo é o modelo de LT, a Figura 1 ilustra a distribuição mundial e número de casos dessa manifestação clínica da Leishmaniose no ano de 2016 (WHO, 2016b).

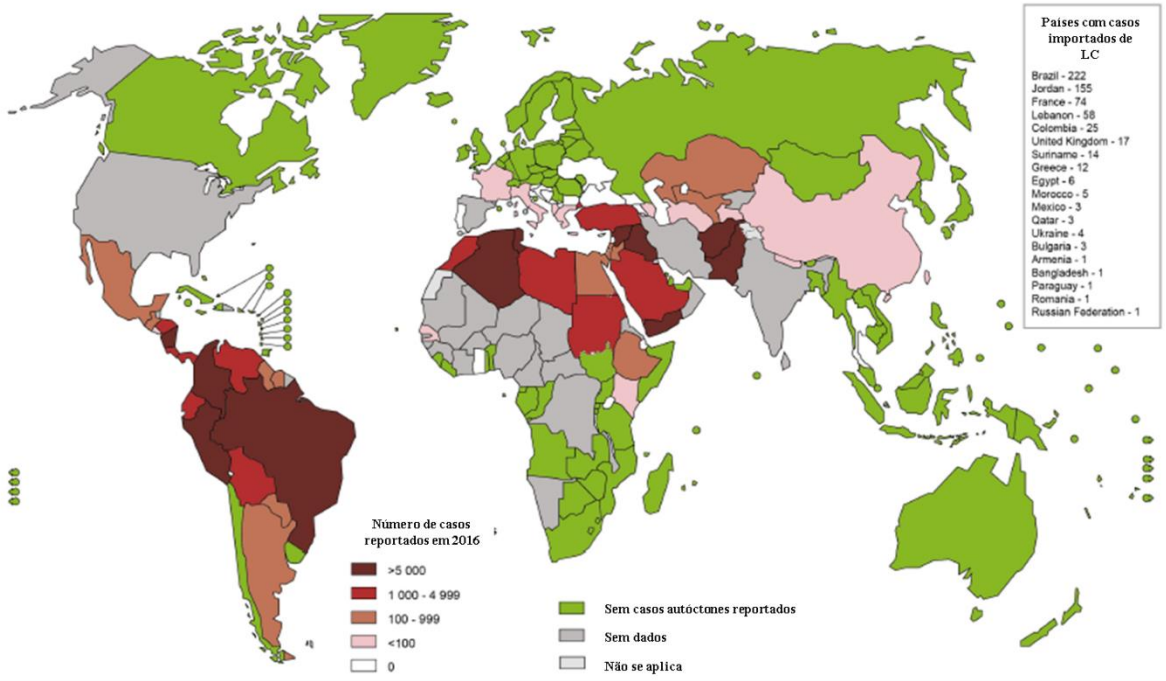

Figura 1. Situação epidemiológica mundial da LT. Extraído e adaptado de Organização Mundial de Saúde, OMS (WHO, World Health Organization), 2016. LC: Leishmaniose cutânea.

No Brasil, a Leishmaniose apresenta-se em franca expansão de casos. É uma doença endêmica e de notificação compulsória, entretanto muitos casos são subnotificados. No ano de 2016 foram notificados 12690 casos de LT e 3200 casos de LV. No ano de 2017 foram reportados 17809 casos de LT e 4297 casos de LV. Neste ano não foram notificados casos importados (WHO, 2017b).

No estado de São Paulo, entre os animais silvestres, os roedores dos gêneros *Proechimys*, *Rhipidomys*, *Oryzomys*, *Akodon*, *Rattus* e o marsupial *Didelphis* são considerados reservatórios da *Leishmania*. Alguns animais domésticos parecem desempenhar um papel secundário. Entre eles, os equídeos, felídeos e canídeos são considerados hospedeiros acidentais, uma vez que não há evidências que comprovem o papel desses animais como reservatório do parasito, frequentemente estes animais são encontrados com lesões em mucosas das vias aéreas superiores. De acordo com dados da Superintendência de Controle de Endemias no estado de São Paulo, a transmissão é caracterizada por três perfis epidemiológicos: *1)* Silvestre, em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); *2)* Ocupacional ou lazer, em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo (antropozoonose); e *3)* Rural ou periurbana, em áreas de colonização ou periurbana, em que

houve adaptação do vetor ao peridomicílio (antropozoonose e/ou zoonose). O aumento do ciclo periurbano tem ocorrido devido à migração da população para áreas de mata, a falta de saneamento básico de algumas regiões aliado ao aumento do número de ratos, aos materiais de construção e o convívio com animais doentes que podem se comportar como reservatórios da doença (BASANO; CAMARGO, 2004). A LT em São Paulo tem apresentado importantes alterações em seus níveis de transmissão, com picos de aumento de casos a cada 15 anos (dados de Sinan, SVS/MS, 2008) (SUCEN, 2008).

1.3 Agente etiológico da Leishmaniose e ciclo biológico do parasito

Atualmente são conhecidas aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* que são capazes de infectar o homem (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Todas as espécies do gênero *Leishmania* são parasitas de mamíferos e são divididos em dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com a localização no interior do intestino do inseto vetor durante o seu desenvolvimento. O subgênero *Viannia* agrupa espécies que inicialmente se desenvolvem no intestino posterior e mais tarde no intestino anterior do inseto transmissor. Já o subgênero *Leishmania* agrupa espécies que se desenvolvem exclusivamente nos intestinos médio e anterior do flebotomíneo (LAINSON; SHAW, 1987).

As principais espécies responsáveis pela LT no Novo Mundo são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni*. *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) aethiopica* são as espécies descritas no Velho Mundo (ASHFORD; BETTINI, 1987; HERWALDT, 1999). Já a LV pode ser causada por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*. No Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenber*g e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003). *L. (L.) amazonensis* é a segunda espécie mais prevalente no Brasil (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2017).

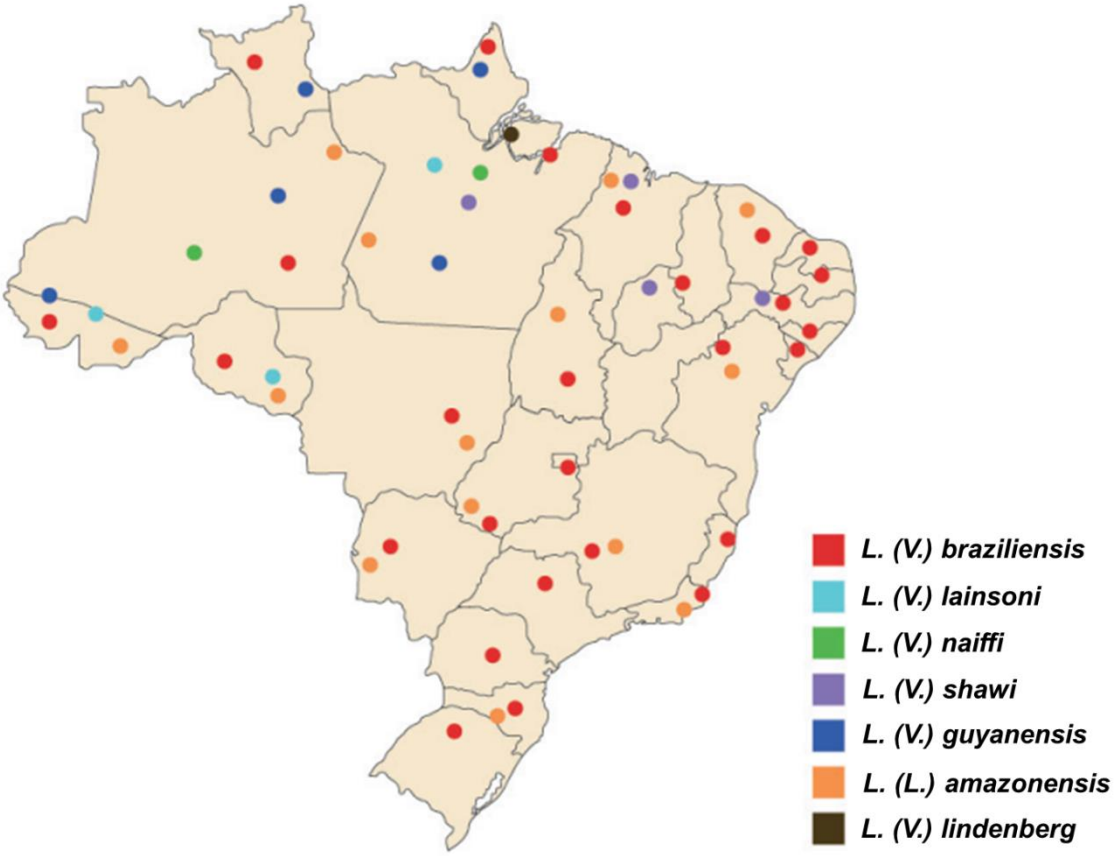

Figura 2. Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da LT no Brasil. Observar que *L. (V.) braziliensis* (representada por círculo vermelho) é a espécie prevalente no Brasil, seguido por *L. (L.) amazonensis* (representada por círculo laranja). Extraído de Manual de Vigilância da LT, Brasil, 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS/MS, 2005).

O protozoário *Leishmania* apresenta ciclo de vida heteroxênico, ou seja, vive alternando entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores, e os insetos vetores transmitem os parasitos aos hospedeiros vertebrados. A transmissão dos parasitos aos hospedeiros vertebrados ocorre durante o repasto sanguíneo pela picada de fêmeas de insetos da família *Psychodidae* que pertencem à subfamília *Phlebotominae* e aos gêneros *Lutzomya* e *Phlebotmus*. Uma vez infectadas com parasitos as fêmeas dos hospedeiros invertebrados inoculam formas promastigotas metacíclicas em mamíferos, estas são as formas infectantes do parasito. Nos hospedeiros mamíferos, os parasitos são fagocitados por células do sistema mononuclear fagocítico e assumem a forma amastigota, de morfologia arredondada e imóvel, que se multiplica especialmente nos macrófagos. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem, liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos. Ao um novo realizar repasto sanguíneo, a fêmea do inseto vetor ingere as células contendo as formas amastigotas, as quais se transformam em formas promastigotas, mantendo

o ciclo (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MAURER; DONDJI; VON STEBUT, 2009). Com o crescimento do parasito no interior de células do sistema fagocítico mononuclear e a resposta imune estabelecida contra o parasito, formam-se lesões características dessa doença. O ciclo de vida de espécie de *Leishmania* é representado na Figura 3.

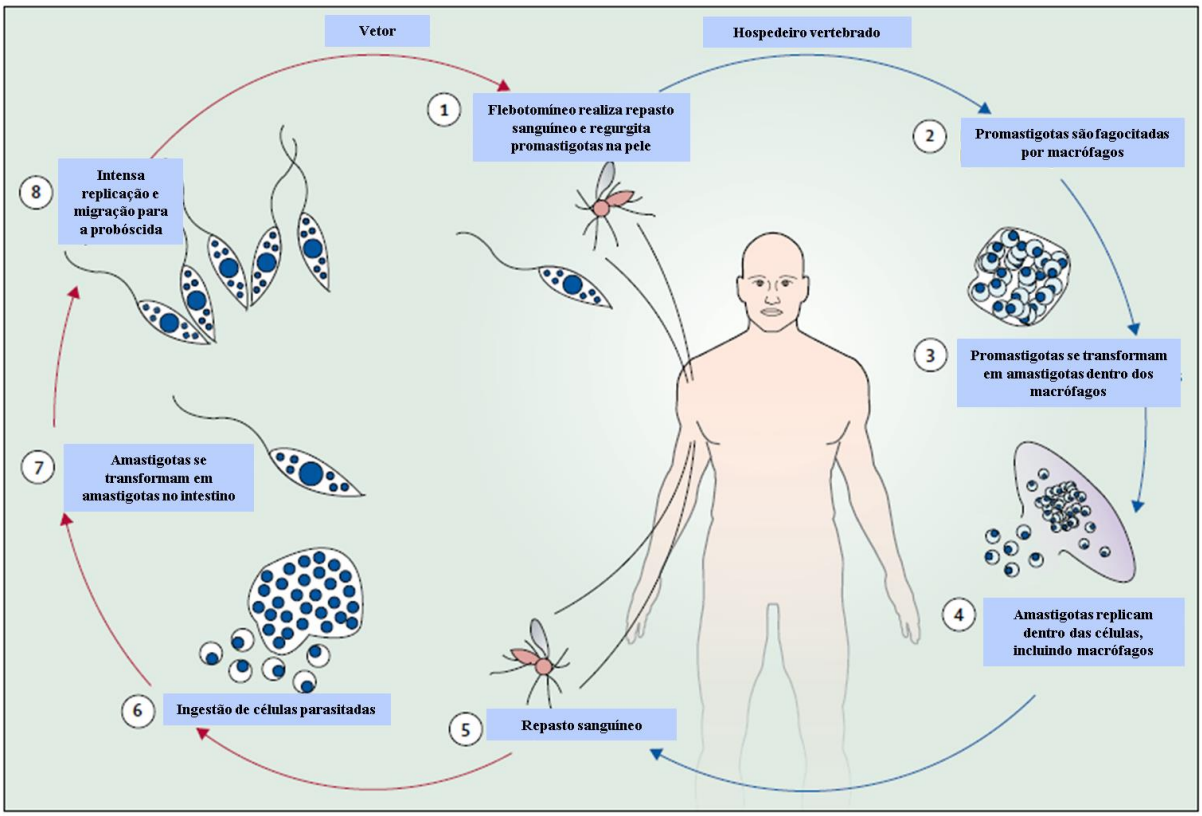

Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro vertebrado pelo inseto vetor e internalizadas em fagócitos. Nestas células, os parasitos assumem a forma amastigota que se multiplica. Com a replicação do parasito, a célula rompe e libera as formas amastigotas que infectam novas células. Fêmeas do inseto vetor infectadas ao realizarem novo repasto sanguíneo dão continuidade ao ciclo. Extraído e adaptado de BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018.

A metaciclogênese é um processo fundamental para aquisição de virulência para protozoários do gênero *Leishmania*, processo no qual promastigotas procíclicas não infectantes se transformam em promastigotas metacíclicas infectantes. Na natureza este processo ocorre no intestino do inseto vetor. Durante o repasto sanguíneo o inseto vetor ingere macrófagos que contém formas amastigotas de *Leishmania*, ao alcançarem o intestino essas formas se transformam em formas promastigotas procíclicas. Estas formas tem a capacidade de se aderir através da expressão de gliconjugados que se ligam à lectinas do epitélio do intestino do vetor para não ocorrer sua excreção (KAMHAWI et al., 2004; MCCONVILLE et al., 1992; SACKS, 2001). Depois de aproximadamente seis dias de intensa replicação por

fissão binária, as promastigotas procíclicas param de se dividir e iniciam o processo de metaciclogênese, no qual ocorre alteração dos glicoconjugados expressos na superfície celular do parasito e a perda da adesão ao intestino do vetor. As formas promastigotas metacíclicas não são replicantes e migram até a probóscide do flebotomíneo e são inoculadas junto com sua saliva durante um novo repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK; MOLYNEUX; ASHFORD, 1974; SACKS; KAMHAWI, 2001). A cultura axênica de promastigotas é capaz de mimetizar a metaciclogênese que ocorre no flebotomíneo (SACKS; PERKINS, 1984). O processo de metaciclogênese em culturas axênicas é ativado por condições de baixo pH (~5,5), falta de nutrientes, condições anaeróbias e alta densidade celular (BATES; TETLEY, 1993; CUNNINGHAM et al., 2001; MÉNDEZ et al., 1999; SACKS; PERKINS, 1984). Promastigotas procíclicas de cultura, que são as promastigotas em fase logarítmica de crescimento, não são infectantes assim como as encontradas no intestino do inseto vetor. Já as promastigotas metacíclicas de cultura, que são promastigotas em fase estacionária de crescimento, são altamente infectantes assim como as encontradas na probóscide do flebotomíneo. Além disso, na cultura axênica é possível observar alterações morfológicas em promastigotas, as formas promastigotas procíclicas são menores, com corpo ovoide e flagelo curto. Por outro lado, as formas promastigotas metacíclicas são maiores, com corpo alongado e flagelo longo (SACKS; PERKINS, 1984). Outro fato interessante é que promastigotas metacíclicas apresentam expressão de glicoconjugados que são essenciais para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (LIU et al., 2009; MAHONEY et al., 1999; TURCO; SACKS, 1991). Os glicoconjugados expressos na superfície de *Leishmania* são descritos no tópico “Glicoconjugados expressos na superfície celular de *Leishmania* sp.”

1.4 Manifestações clínicas das Leishmanioses

As Leishmanioses podem ser divididas em dois tipos, de acordo com os órgãos que são acometidos: LT (LT americana, no Novo Mundo e LT do Velho Mundo), que acomete a pele e mucosas; e a LV, que acomete as vísceras, principalmente baço, fígado e medula óssea. A progressão da doença depende de alguns fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida e a interação entre parasito e seu hospedeiro. Ainda, a LT pode apresentar as seguintes manifestações clínicas: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCDf), Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM) e Leishmaniose Mucosa (LM) (GONTIJO;

CARVALHO, 2003). Nosso modelo de infecção experimental é um modelo murino de LT, portanto o foco deste trabalho são as manifestações tegumentares dessa doença.

A forma tegumentar dessa parasitose não apresenta risco de vida, mas a evolução da doença pode levar a problemas com reflexos psicológicos e sociais devido às lesões que podem ser desfigurantes (BENNIS et al., 2018; YANIK et al., 2004). As lesões em formato de pápula começam a se desenvolver após algumas semanas a meses após a picada do flebotomíneo. A lesão pode ser única, devido a uma única picada, ou múltiplas lesões, indicando múltiplas picadas pelo inseto vetor ou propagação pelo sistema linfático (THOMAIDOU et al., 2015). É importante destacar que a lesão inicial é difícil de ser diagnosticada e muitas vezes pode ser confundida com um furúnculo, infecção fúngica por *Paracoccidiodes brasiliensis*, histoplasmose cutânea, esporotricose, cromoblastomicose, neoplasia cutânea, infecção bacteriana não curada. Por isso, um diagnóstico diferencial inicial é fundamental para correto prognóstico e tratamento (DAVID; CRAFT, 2009).

As manifestações clínicas da LT são dependentes, principalmente, da resposta imunológica do hospedeiro e espécie de *Leishmania* envolvida. No Brasil, as espécies que são responsáveis por um maior número casos são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, e essas espécies têm despertado bastante interesse na compreensão entre polimorfismos genéticos e manifestações clínicas devido à espécie de *Leishmania* envolvida (QUARESMA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2009; SOUZA CASTRO et al., 2018). *L. (L.)* amazonensis é uma espécie que pode causar diversas manifestações clínicas incluindo a forma cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LCD) e a manifestação clínica mais grave das manifestações tegumentares da leishmaniose que é a forma cutânaea difusa (LCDf) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Recentemente, foi descrito um caso de LV canina causada por *L. (L.) amazonensis* (VALDIVIA et al., 2017).

A forma cutânea localizada (LCL) é a manifestação clínica mais frequente. As lesões, única lesão ou em pequeno número (Leishmaniose cutânea disseminada - LCD), são localizadas exclusivamente na pele e tendem a cicatrização espontânea. Nesta forma clínica a imunidade celular está preservada, com predominância de citocinas do tipo Th1 (SILVEIRA et al., 2009). Por isso, na LCL observamos tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento. Considera-se que algumas pessoas possam se infectar sem desenvolver a doença, pois em áreas endêmicas podem ser encontrados indivíduos positivos ao teste de Montenegro (reação de hipersensibilidade do tipo tardio), mas sem historia de LT e sem cicatrizes

compatíveis com a doença. A LCL pode ser causada por todas as espécies dermotrópicas de *Leishmania* (BRASIL, 2017).

Em alguns pacientes sem causas conhecidas de imunodeficiência, a LC pode evoluir para uma resposta celular anérgica para antígenos de *Leishmania*, ou seja, completa ausência de resposta imunológica celular. Esta manifestação clínica é conhecida como leishmaniose cutânea difusa (LCDf), uma manifestação rara dessa parasitose (SILVEIRA et al., 2009). A anergia celular está associada à acentuada proliferação dos parasitos e a disseminação da infecção. No Brasil, é associada exclusivamente a infecção causada por *L. (L.) amazonensis*. Ha evidências de que *L. (L.) amazonensis* tem uma capacidade particular de interferir negativamente em vários mecanismos imunológicos necessários para a ativação de mecanismos microbicidas (CAMPOS et al., 2018; GALUPPO et al., 2018; SILVEIRA et al., 2009). Algumas características particulares têm sido atribuídas às diferentes espécies de *Leishmania*. Já foi observado que as lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* têm bordas infiltradas. A análise histológica mostrou que estas lesões apresentam um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolados contendo abundantes parasitos (BRASIL, 2017).

Na Leishmaniose mucosa (LM), o agente etiológico principal é a *L. (V.) braziliensis* e espécies do subgênero *Viannia*. Esta manifestação clínica é caracterizada imunologicamente pelo exacerbamento das respostas celulares, com alta produção de IFN-γ e TNF-α, e pela escassez de parasitos no local da lesão. Na LM, esta resposta imunológica exacerbada esta associada a uma baixa produção de IL-10, uma citocina capaz de modular a resposta imunológica (SILVEIRA et al., 2009).

Um ponto importante é que a cura da Leishmaniose não é estéril, é indicado o uso do termo médico cura clínica após o sucesso no tratamento. Há relatos de isolamento parasitos viáveis de cicatrizes de LT em indivíduos curados há anos (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017; MENDONÇA et al., 2004). Este fenômeno poderia explicar o aparecimento de recidivas tardias (DARCIS et al., 2017), como também o surgimento da doença em pacientes imunocomprometidos, como no caso da co-infecção por vírus HIV (OKWOR; UZONNA, 2013).

1.5 Glicoconjugados expressos na superfície celular de *Leishmania* sp.

O termo glicoconjugado se refere a qualquer molécula que possua algum motivo de carboidrato ligado covalentemente a outra classe de moléculas como lipídeos ou proteínas.

Os glicoconjugados expressos na superfície de *Leishmania* apresentam importância crítica para o desenvolvimento de formas promastigotas no intestino do vetor, e estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. Dessa forma, estes glicoconjugados permitem que formas promastigotas se liguem ao intestino e não sejam degradadas por enzimas digestivas do vetor, o escape do sistema complemento na corrente sanguínea do hospedeiro e a sobrevivência em ambientes hostis, como o ambiente intracelular de macrófagos, e evasão da lise fagolisossômica dentro de células fagocíticas no hospedeiro (DESCOTEAUX; TURCO, 1999; SACKS; KAMHAWI, 2001; TURCO; DESCOTEAUX, 1992; VOLF et al., 2014). Estas moléculas também atuam como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês pathogen-associated molecular pattern) (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

A membrana de *Leishmania* apresenta um glicocálice formado por glicoproteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) que medeiam interações entre parasito e hospedeiro. Os principais glicoconjugados expressos na superfície de *Leishmania* (Figura 4) são lipofosfoglicana (LPG), glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs), fosfoglicana extracelular (PG), metaloprotease de 63 kDa (gp63), fosfatase ácida secretada (sAP) e proteofosfoglicanas (PPG) (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Todas as espécies de *Leishmania* expressam em sua superfície estes glicoconjugados. Neste trabalho daremos ênfase ao glicoconjugado LPG.

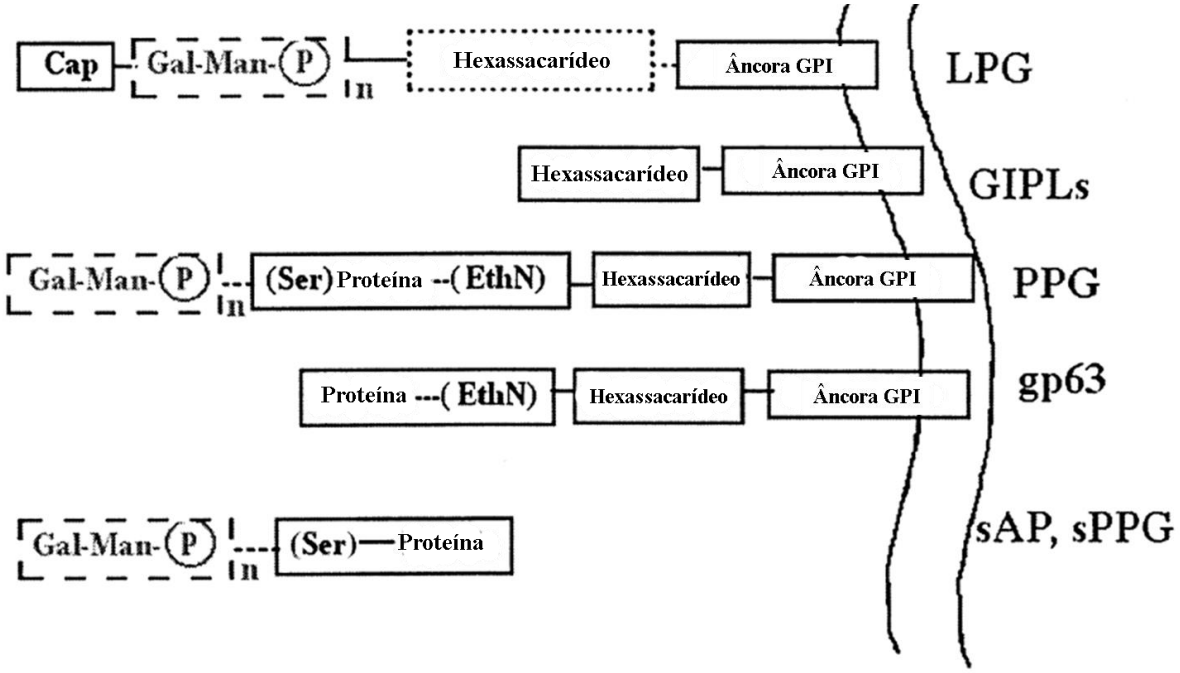

Figura 4. Representação dos principais glicoconjugados presentes na superfície celular promastigotas de espécies de *Leishmania*. O domínio de hexassacarídeos é comum aos glicoconjugados acorados à membrana. Notar que alguns glicoconjugados estão ancorados na membrana através da âncora lipídica de GPI. Nos proteofosfoglicanos (sPPG) e nas fosfatases ácidas (sAP) as unidades repetitivas estão ligadas ao polipeptídeo através de Man-PO_4-serina. LPG: lipofosfoglicana. GIPLs: glicoinositolfosfolipídeos. PPG: proteofosfoglicana. Gp63: metaloprotease de 63 kDa. sAP: fosfatase ácida secretada. sPPG: proteofosfoglicana secretada. Extraído e adaptado de SACKS e KANHAWI, 2001.

Os glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) são os glicolipídeos majoritários da superfície celular de *Leishmania* e não estão ligados à proteínas e nem fosfoglicanas. São expressos tanto por formas promastigotas quanto por formas amastigotas do parasito. Sua estrutura básica preservada é composta por glicanas $Gal_n(\alpha1,3)Man_p(\alpha1,3)Man_p(\alpha1,4)GlcN_p$ ligadas a porção lipídica por um fosfoinositol (PI) (MCCONVILLE et al., 1990). Estes glicolipídeos apresentam polimorfismos entre espécies de *Leishmania*. Enquanto que alguns dos GIPLs são expressos em alto número de cópias na superfície celular, a maioria dos GIPLs tem uma localização predominantemente intracelular. Esses GIPLs localizados intracelularmente participam como precursores biossintéticos do LPG (MCCONVILLE; BACIC, 1990).

Outro glicoconjugado que apresenta interação entre as células do hospedeiro e parasito é a metaloprotease gp63, sendo expressa tanto por formas promastigotas quanto por formas amastigotas. Em relação à sua localização celular, uma pequena parte é expressa intracelularmente no reticulo endoplasmático, e a maioria dessa proteína é expressa na superfície celular do parasito, outra parte é liberada na forma secretada ou clivada de

membrana (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). É considerada uma proteína de virulência do parasito, alterando mecanismos de sinalização celular na célula hospedeira. É responsável por aumentar a resistência de *Leishmania* ao peptídeo antimicrobiano do hospedeiro, sobrevivência do parasito dentro do fagossomo de macrófagos e resistência à lise mediada pelo sistema complemento (CHAUDHURI et al., 1989; CHAUDHURI; CHANG, 1988; MCGWIRE et al., 2002). Pouco é conhecido sobre a fosfatase ácida (sAP), sendo considerada também como fator de virulência. Já foi sugerido seu papel no bloqueio da produção de radicais livres de oxigênio por neutrófilos (OLIVIER et al., 2012; REMALEY et al., 1985, 1984).

O LPG é o glicoconjugado expresso na superfície de *Leishmania* mais estudado dentre eles. O LPG é um dos glicolipídeos expressos em abundância na superfície celular de formas promastigotas, enquanto que no estágio de amastigota o LPG sofre regulação negativa. Além disso, o LPG sintetizado por formas amastigotas apresenta diferenças do sintetizado por formas promastigotas (GLASER et al., 1991; MOODY et al., 1993; TURCO; SACKS, 1991). O LPG de todas as espécies de *Leishmania* é organizado em quatro domínios, conforme representado na Figura 4. Esses domínios são uma âncora lipídica conservada composta por 1-O-alquil-2-lisofosfatidilinositol, essa âncora lipídica é ligada a um domínio conservado de hexassacarídeo ("glycan core") composto por Gal(α1,6)Gal(α1,3)Gal_f(β1,3)[Glcα1-PO_4]Man(α1,3)Man(α1,4)-GlcN, uma região de unidades repetitivas de dissacarídeos fosfatados Gal(β1,4)Man(α1,3)-PO_4, e um pequeno oligossacarídeo terminal (DE ASSIS et al., 2012; DESCOTEAUX; TURCO, 1999; TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

A âncora lipídica em todas as espécies de *Leishmania* apresenta a mesma estrutura. Entretanto, a estrutura das unidades repetitivas de Gal-Man-PO_4 do LPG é conservada, mas pode sofrer adição de açúcares em suas cadeias laterais. Também há pequenas alterações na estrutura do oligossacarídeo terminal. Essas alterações são responsáveis pelo polimorfismo do LPG entre as diferentes espécies e cepas de *Leishmania* (COELHO-FINAMORE et al., 2011; DE ASSIS et al., 2012; MAHONEY et al., 1999; MCCONVILLE et al., 1992; NOGUEIRA et al., 2016; SOARES et al., 2004; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Esse polimorfismo é devido a variações na quantidade e tipo de glicosilações que as unidades repetitivas de dissacarídeos do LPG podem sofrer. A principal alteração intraespécie ocorre durante o processo de metaciclogenênese, em que as unidades repetitivas dobram em tamanho e sofrem adição de açúcares na cadeia lateral das unidades repetitivas de dissacarídeos fosfatados (MCCONVILLE et al., 1992; SACKS; BRODIN;

TURCO, 1990; TURCO; SACKS, 1991). Assim, formas promastigotas procíclicas de *L. (L.) major* apresentam a cadeia lateral das unidades repetitivas de dissacarídeos com adição de galactose, enquanto que formas promastigotas metacíclicas apresentam adição de resíduos de arabinose (MCCONVILLE et al., 1992). Essa alteração no LPG é fundamental para adesão ao intestino do vetor e estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. Outras alterações estágio específicas nessa estrutura de diferentes espécies de *Leishmania* já foram descritas (SACKS, 2001). No nosso trabalho utilizamos o LPG purificado de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (que contém formas promastigotas procíclicas e promastigotas metacíclicas) de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8. O LPG desta cepa de *Leishmania* apresenta em sua estrutura unidades repetitivas de dissacarídeos Gal(β1,4)Man(α1)-PO_4 e cadeias laterais ricas em β-glicose (NOGUEIRA et al., 2016, 2017). A estrutura deste LPG está representada na Figura 5. *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 é uma cepa de referência da OMS e foi isolada do inseto vetor, conforme descrito no item *Materiais e Métodos*.

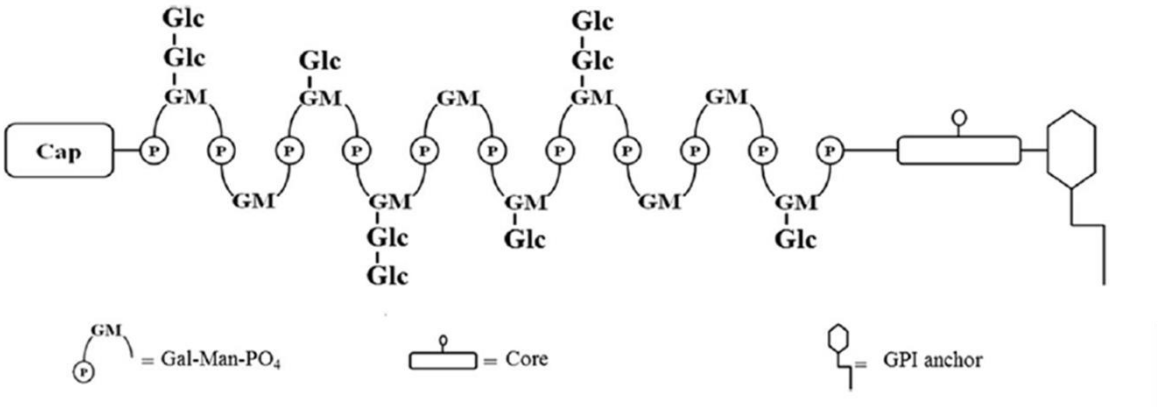

Figura 5. Representação esquemática do LPG de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8. As unidades repetitivas contêm o dissacarídeo fosfatado Gal(β1,4)Man(α1)-PO_4 como estrutura principal. O LPG desta cepa contém substituições nas cadeias laterais de um ou dois resíduos de β-glicose. Os locais precisos das cadeias laterais de açúcar nos domínios das unidades repetitivas não são conhecidos. Cap: oligossacarídeo terminal. GPI anchor: âncora lipídica GPI. Core: hexassacarídeo conservado. Glc: β-glicose. Gal: galactose. Man: manose. PO_4: fosfato. Extraído de Nogueira et al., 2017.

1.6 Eventos iniciais para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* e resposta imunológica na Leishmaniose

Como descrito nos tópicos anteriores, as promastigotas são rapidamente internalizadas em células do sistema fagocítico, especialmente macrófagos. Para se preservar

dentro do ambiente hostil que o macrófago oferece, a *Leishmania* desenvolveu diversas estratégias para promover o escape aos mecanismos leishmanicidas do macrófago e desenvolvimento de uma resposta imunológica eficaz. Após a transmissão de formas promastigotas metacíclicas para o hospedeiro vertebrado, são recrutados macrófagos e neutrófilos para o sítio de infecção (PETERS et al., 2008). Não ocorre a diferenciação de promastigotas em amastigotas em neutrófilos infectados, foi observado que após a apoptose dessas células ocorre a infecção em macrófagos (MOLLINEDO et al., 2010). Estudos demonstram que promastigotas metacíclicas de *L. (L.) donovani* são fagocitadas por macrófagos derivados de medula óssea de camundongo após 10 a 20 minutos após infecção (FORESTIER et al., 2011). Dessa forma, é possível notar que os macrófagos são essenciais para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. A interação inicial entre parasito e macrófago ocorre através do flagelo da *Leishmania*, que ativa liberação de sinalizadores celulares e subsequente modulação da atividade fagocitária do macrófago para sobrevivência do parasito (FORESTIER et al., 2011; ROTUREAU et al., 2009). A internalização de formas promastigotas metacíclicas é dependente dos microdomínios de colesterol da membrana dos macrófagos, enquanto que a fagocitose de amastigotas é independente desses microdomínios (PUCADYIL et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2011).

A diferenciação de promastigotas para amastigotas é ativada no vacúolo parasitóforo por aumento de temperatura e diminuição de pH. Além disso, para *L. (L.) amazonensis* a absorção de ferro e subsequente geração de peróxido de hidrogênio tem demonstrado ser um sinal de ativação da diferenciação de promastigotas para amastigotas (MITTRA et al., 2013; MITTRA; ANDREWS, 2013). A replicação e sobrevivência de amastigotas no vacúolo parasitóforo depende da interação entre essa vesícula e o retículo endoplasmático da célula hospedeira, atuando como fonte de nutrientes para o parasito (CANTON et al., 2012; NDJAMEN et al., 2010).

Macrófagos em estado de repouso atuam na homeostase do organismo por promover a limpeza de células mortas e detritos, enquanto que macrófagos ativados atuam na resposta imunológica inata. Os macrófagos são células do sistema imunológico e participam ativamente na reposta imunológica inata contra *Leishmania*. Um dos principais meios para eliminação de patógenos intracelulares é a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI) (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Estudos recentes demonstraram que na infecção por *L. (L.) amazonensis* o óxido nítrico (NO) é produzido em macrófagos derivados de medula óssea após ativação do inflamassoma de

NLRP3, com consequente controle da infecção (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Além disso, macrófagos classicamente ativados utilizam arginina para produção de NO, este aminoácido é esgotado para que corra a produção desse mediador microbicida, assim essa privação nutricional poderia contribuir para a restrição da multiplicação celular de *Leishmania* nesses macrófagos. Enquanto que, macrófagos alternativamente ativados apresentam aumento da disponibilidade de ornitina e uréia para biossíntese de poliaminas, o que pode contribuir para o crescimento do parasito no interior destes macrófagos (NADERER; MCCONVILLE, 2008). Ainda, os macrófagos são ativados por IFN-γ, uma citocina produzida por linfócitos Th1, e utilizam mecanismos microbicidas para promover a morte de *Leishmania*. Já a ativação alternativa de macrófagos ocorre pela síntese de IL-4, produzida por linfócitos Th2, ocorrendo inibição da inflamação por aumento de IL-4 e IL-10, com consequente aumento do parasitismo celular e progressão da doença (LIU et al., 2009; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Leishmania dispõe de vários mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro, o parasito consegue manipular de forma seletiva a produção de citocinas para promover a sua sobrevivência. A infecção por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos isolados de lavado peritoneal de camundongos, previamente ativados por LPS, causou a supressão de IL-12, IL-17 e IL-6, sendo essas citocinas importantes para estabelecimento de uma resposta inflamatória eficaz para controle da infecção. Já as citocinas que apresentam papel regulador, IL-10, IL-1α, TNF-α e quimiocinas MIP-1 e MCP-1 estavam aumentadas (LAPARA; KELLY, 2010). Outros trabalhos demostraram que após a infecção por *Leishmania* ocorre redução de IL-12, NO, TNF-α, maturação fagolisossomal e redução da apresentação de antígenos por MHC-II (LIU et al., 2009; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). Já foi descrito que *L. (L.) donovani* interfere na via de sinalização da Janus quinase - transdutor de sinal e ativação (JAK-STAT), inibindo a consequente ativação de macrófagos (MATTE; DESCOTEAUX, 2010). *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* induzem autofagia em macrófagos (CYRINO et al., 2012; FRANCO et al., 2017), que tem associação com provisão de nutrientes para o parasito. No caso da infecção experimental por *L. (L.) major* que induz autofagia através de receptores endossomais do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll like receptors*) seria um mecanismo leishmanicida utilizado pelos macrófagos (FRANCO et al., 2017). Além de já ter sido descrito que *L. (L.) donovani* induz inibição da apresentação de antígenos por macrófagos (MEIER; SVENSSON; KAYE, 2003).

Leishmania também apresenta glicoconjugados em sua superfície que auxiliam o estabelecimento da infecção no macrófago. O LPG auxilia no estabelecimento inicial da infecção com a proteção de formas promastigotas de *Leishmania* contra a lise mediada pelo complemento, adesão e auxílio na entrada em macrófagos e modulação da expressão da óxido nítrico sintetase (BRITTINGHAM; MOSSER, 1996; PROUDFOOT et al., 1996; SPATH et al., 2003). Muitos trabalhos demonstraram funções do LPG de *L. (L.) major*, uma espécie responsável pela LT no Velho Mundo. Entretanto, pouco se conhece sobre as funções do LPG de *L. (L.) amazonensis* na interação com o macrófago. Já foi descrito que o LPG de *L. (L.) amazonensis* ativa armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracelular traps*), indução de proteína quinase R (PKR), ativação e morte do parasito via leucotrieno B4 (LTB4), *L. (L.) amazonensis* libera vesículas extracelulares que contém LPG e aumentam a produção de IL-6 e IL-10 por macrófagos, ativação de caspase-11 e ativação do inflamassoma de NLRP3 por via não canônica (BARBOSA et al., 2018; DE CARVALHO et al., 2019; DE CARVALHO VIVARINI et al., 2011; GUIMARAES-COSTA et al., 2009; TAVARES et al., 2014).

Os trabalhos visando compreender a interação *Leishmania* e macrófago tentam compreender a complexa relação entre parasito e hospedeiro, com consequente estabelecimento da infecção e respostas imunológicas que promoverão o controle da infecção ou uma doença em progressão.

1.8 Infecção experimental por *Leishmania*: modelo murino de infecção

A infecção por *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) major* em camundongos são modelos de LT amplamente utilizados para mimetizar a infecção humana. A resistência na LT causada por *L. (L.) major* é criticamente dependente do desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo Th1. Sabe-se que qualquer falha na indução de uma eficiente resposta Th1 resulta em doença progressiva. Os modelos murinos de LT causada por *L. (L.) major* indicam papéis distintos da produção de IL-4 no desenvolvimento de suscetibilidade, e da produção de IFN-γ dependente de IL-12 na resistência à doença (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). As respostas de resistência e suscetibilidade no modelo de infecção experimental por *L. (L.) major* estão bem estabelecidas, entretanto na infecção por *L. (L.) amazonensis* ainda há lacunas (AFONSO; SCOTT, 1993; DE SOUZA et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2006; SOONG et al., 1997). Contudo, após a infecção com *L. (L.)*

amazonensis, na maioria das linhagens de camundongos, ocorre progressão da doença sem a evidente expansão de células Th2 produtoras de IL-4 (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; SOONG et al., 1997; VANLOUBBEECK et al., 2004). Estes dados, em conjunto, indicam que não apenas o fenótipo de células T $CD4^+$ é fundamental como indicativo de proteção da doença causada por *L. (L) amazonensis*.

A resposta protetora contra *Leishmania* sp. é mediada por células do sistema imunológico. Resumidamente, na resposta protetora contra *Leishmania*, antígenos de do parasito são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) que secretam IL-12, citocina responsável para a diferenciação de células T do perfil Th0 para um perfil Th1. Esta resposta de perfil Th1 é fundamental para a resistência contra *Leishmania* sp., uma vez que estas células produzem grande quantidade de IFN-γ e TNF-α que ativam os macrófagos infectados a destruírem o parasito através da produção de NO (HEINZEL et al., 1993; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SYPEK et al., 1993). Já na resposta de suscetibilidade, também mediada por células, ocorre alta produção de IL-4, IL-10 e TGF-β. Entretanto, ainda não está bem estabelecido como é desencadeado este processo. Sabe-se ainda que o desenvolvimento de uma resposta Th2 leva ao desenvolvimento de graves lesões em camundongos infectados com *L. (L.) major* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SCOTT, 1989). O modelo de resistência e suscetibilidade na Leishmaniose experimental tem sido desafiado, revelando que há complexidade na regulação de citocinas para aquisição de mecanismos de resistência imunológica e evasão das respostas imunológicas (HIMMELRICH et al., 2000; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). A citocina IL-10, apesar de não ser mediadora dominante na susceptibilidade de BALB/c na infecção por *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.) amazonensis*, tem papel importante na regulação do desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora e, se neutralizada junto com a IL-4, leva à resolução efetiva da doença (PADIGEL; ALEXANDER; FARRELL, 2003).

No caso da infecção experimental por *L. (L.) major* vários estudos demonstram que algumas linhagens de camundongos são suscetíveis à infecção, enquanto outros são naturalmente resistentes. Este fato demonstra que fatores genéticos do hospedeiro são responsáveis pela progressão da doença. Portanto, o fundo genético (*background*) do camundongo é um ponto importante ao se analisar a infecção murina por *Leishmania* sp. Alguns trabalhos publicados demonstram que camundongos da linhagem BALB/c são naturalmente suscetíveis à infecção por *Leishmania* sp., enquanto que camundongos da linhagem C57BL/6 são resistentes à infecção (HANDMAN; CEREDIG; MITCHELL, 1979;

SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Devido às diferenças de polarizações de resposta imunológica entre as diferentes linhagens de camundongos vários trabalhos foram desenvolvidos para mapear genes de resistência e/ou suscetibilidade na infecção murina por *Leishmania* sp (BARTON; WHITEHEAD; BLACKWELL, 1995; BEEBE et al., 1997; LIPOLDOVÁ et al., 2000; MOCK et al., 1993; ROBERTS et al., 1997). O gene murino *NRAMP1* (*natural resistance associated macrophage protein 1*) tem sido descrito como determinante no desenvolvimento de LV (BARTON; WHITEHEAD; BLACKWELL, 1995). A proteína codificada por este gene está localizada na membrana do fagolisossoma e tem envolvimento no transporte transmembrana de cátions bivalentes (FORBES; GROS; DC, 2003). Camundongos da linhagem BALB/c são mutantes para este gene, sendo este um dos fatores responsáveis por sua maior suscetibilidade à infecção por *Leishmania* sp (BARTON; WHITEHEAD; BLACKWELL, 1995).

Camundongos C57BL/6 são capazes de controlar a infecção por *L. (L.) major* através do desenvolvimento de uma resposta imune Th1. Este fenótipo resistente é sustentado pela presença de IL-12 e expressão de seu receptor IL-12Rβ. Além da ativação do fator de transcrição T-bet (HONDOWICZ et al., 2000; JONES et al., 1998; PARK; HONDOWICZ; SCOTT, 2000; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). A lesão cutânea provocada pela infecção por *L. (L.) major* é resolvida e apresenta baixa carga parasitária (REINER; LOCKSLEY, 1995; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Em contraste, camundongos C57BL/6 quando infectados com *L. (L.) amazonensis* ocorre o desenvolvimento de lesões cutâneas crônicas contendo grande quantidade de parasitos. Este fenótipo está associado a baixos níveis tanto de IFN-γ e IL-4 no linfonodo drenante (SOONG et al., 1997; VANLOUBBEECK et al., 2004). Sugerindo que uma população de células de memória antígeno específicas ou células efetoras podem não se desenvolver e persistir após a infecção por este parasito.

Dessa forma, a escolha da linhagem que será utilizada para infecção experimental por *Leishmania* sp. apresenta importância crítica para a progressão da doença. Ainda, para a resolução da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* é fundamental um balanço entre citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias.

1.9 As Galectinas

As Galectinas são proteínas do tipo lectinas, também conhecidas como proteínas ligadoras de glicanas, que se ligam a carboidratos de modo reversível e específico (do inglês,

glycan-binding proteins - GBP). A atividade de reconhecimento de β-galactosídeos das galectinas é associada a uma região polipeptídica destas proteínas, conhecida como domínio de reconhecimento de carboidrato (do inglês, *carbohydrate recognition domain* - CRD). As galectinas reconhecem β-galactosídeos que contêm preferencialmente seqüências de N-acetillactosaminas (LacNac), sendo os resíduos terminais β-galactose e o tamanho da cadeia de polilactosamina requerimentos críticos para a capacidade de reconhecimento de carboidratos dessas lectinas (CUMMINGS; LIU; VASTA, 2017; STOWELL et al., 2004).

Até o momento, a família das galectinas apresenta 15 membros que são classificadas de acordo com a estrutura dos seus CRDs: *1)* Prototípica, são aquelas que apresentam um único CRD e podem existir como monômero ou homodímeros não covalentes. São integrantes deste grupo Gal-1 (Gal-1), Gal-2, Gal-5, Gal-7, Gal-10, Gal-11, Gal-13, Gal-14 e Gal-15; *2)* Quimera, são aquelas que apresentam um CRD e um domínio amino-terminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina, o qual é sensível a metaloproteinases e contribui para a oligomerização dessas lectinas. A única galectina deste tipo é a Gal-3; *3)* Repetição em tandem, são aquelas compostas por polipeptídeos únicos compostos por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo ligador de 5 a 50 resíduos de aminoácidos. São integrantes deste grupo Gal-4, Gal-6, Gal-8, Gal-9 e Gal-12 (CUMMINGS; LIU; VASTA, 2017; NIO-KOBAYASHI, 2017; RABINOVICH; TOSCANO, 2009). A Figura 6 ilustra a classificação das Galectinas de acordo com a estrutura dos seus CRDs. Embora as Galectinas reconheçam β-galactosídeos, a afinidade de ligação de cada subtipo de Galectina difere dependendo da estrutura do glicoconjugado; ou seja, se é uma glicoproteína ou um glicolipídeo, N-glicano ou O-glicano, ligações na galactose do tipo 1(β1,3) ou do tipo 2 (β1,4), e de acordo com o número de ramificações em N-glicanas. Além disso, outras modificações como sialilação, fucosilação e sulfatação de resíduos de galactose também podem afetar a afinidade de ligação das galectinas (NIO-KOBAYASHI, 2017; RABINOVICH; TOSCANO, 2009).

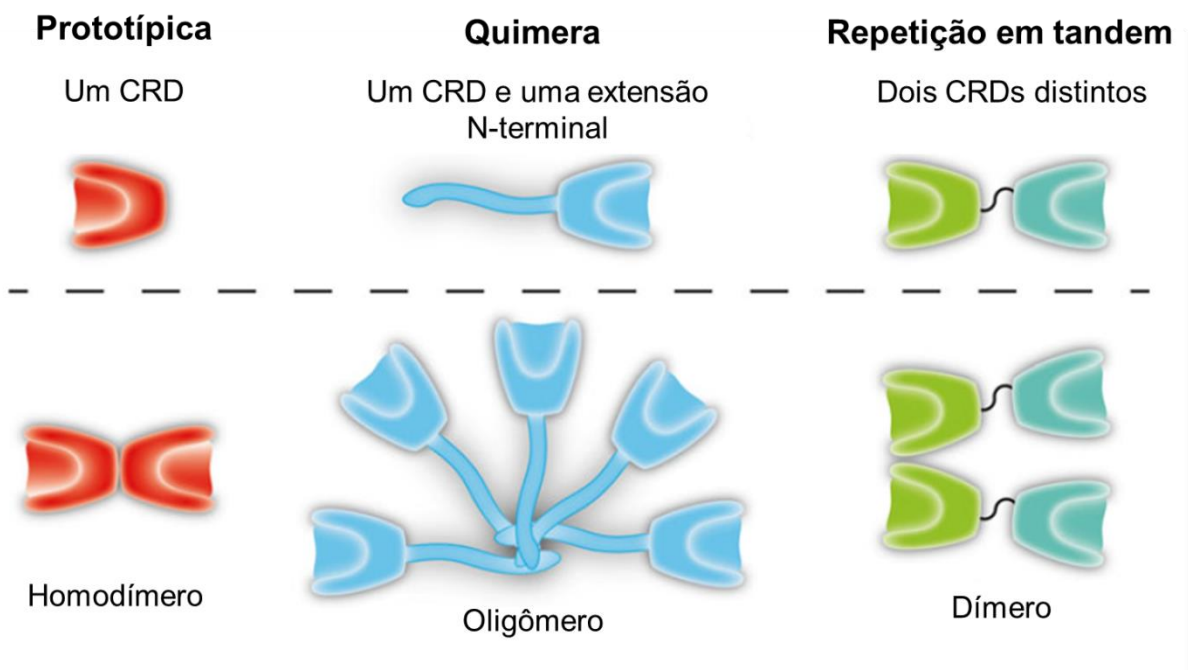

Figura 6. Representação esquemática da classificação das galectinas. Galectinas são proteínas ligadoras de β-galactosídeos e são classificadas em três grupos distintos de acordo com a sua estrutura quaternária: prototípica, quimérica e repetição em tandem. Prototípica: Gal-1, Gal-2, Gal-7, Gal-10, Gal-13 e Gal-14. Quimérica: Gal-3. Repetição em tandem: Gal-4, Gal-8, Gal-9 e Gal-12. Extraído e adaptado de Arthur et al., 2015.

As galectinas participam de diversos processos biológicos e/ou patológicos e podem ser expressas por vários organismos como animais, plantas, fungos, bactérias e vírus (KILPATRICK, 2002; SHARON; LIS, 2004). São expressas por uma grande variedade de tipos celulares e podem participar de interações célula-célula e célula-matriz extracelular e modular funções celulares (CAMBY, 2006). De modo interessante, no espaço extracelular, a interação dessas galectinas com glicanas das superfícies de células do sistema imunológico pode promover a modulação da produção de citocinas e mediadores, adesão celular, apoptose, quimiotaxia e endocitose. Já num ambiente intracelular, as galectinas podem participar de vias de sinalização e modular algumas respostas biológicas, como apoptose, diferenciação e migração celulares. Assim, essas proteínas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resposta inflamatória, doenças autoimunes, aterosclerose, processos infecciosos e câncer (BURLINA et al., 2019; CHEN et al., 2019b; HUANG et al., 2019; LIU; RABINOVICH, 2005; RABINOVICH; LIU, 2010). Na literatura, vários achados reportam o potencial uso terapêutico de galectinas recombinantes, ou inibidores específicos dessas proteínas, para diferentes tipos de doenças.

A Gal-1 (Gal-1) é uma proteína com peso molecular aparente de 14,9 kDa que reconhece β-galactosídeos de modo específico. Foi a primeira galectina a ser descoberta e

descrita. Gal-1 é codificada pelo gene *LGALS1*, que está localizado no cromossomo 22q12. O transcrito deste gene tem 0,6 kb é resultado do *splicing* de quatro exons, resultando em uma proteína de 135 aminoácidos (CAMBY, 2006). É uma galectina do tipo prototípica, isso significa que apresenta um único CRD e pode se encontrar como monômero ou homodímero (CUMMINGS; LIU; VASTA, 2017) Pode ser secretada por tecido adiposo (RHODES et al., 2013), células estromais no timo, linfonodos, células endoteliais (PERILLO et al., 1995) e células da placenta (THAN et al., 2008). Essa lectina está presente tanto no meio extracelular como no meio intracelular, é expressa diferentemente por diversos tecidos, tanto normais como patológicos, e participa de vários processos biológicos, como controle da adesão celular, sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, apoptose, gênese de tumores, fagocitose, processos alérgicos, interações patógeno-hospedeiro, imunorregulação, diferenciação hematopoiética, embriogênese e ciclo menstrual (CAMBY, 2006; DIAS-BARUFFI et al., 2003; LEFFLER et al., 2002; LIU; RABINOVICH, 2005; PERILLO et al., 1995; RABINOVICH; ILARREGUI, 2009).

A Gal-4 (Gal-4) é uma galectina com peso molecular aparente de 36 kDa do tipo repetição em tandem, isto significa que apresenta dois CRDs distintos: CRD1 (N-terminal) e CRD2 (C-terminal). Cada um destes CRDs apresentam aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos, com 40% de identidade, ligados por um peptídeo ligador (JIANG et al., 1999; ODA et al., 1993; RUSTIGUEL et al., 2016). A região do peptídeo ligador contém 30 resíduos de aminoácidos ricos em prolina e glicina, este peptídeo é sensível à degradação por proteases teciduais (RUSTIGUEL et al., 2015). Gal-4 é codificada pelo gene *LGASL4* localizado no cromossomo 19 q13.1-13-3. O transcrito tem 1 kb e é resultado do splicing de nove exons (BARONDES et al., 1994; CAO; GUO, 2016; GITT et al., 1998). Assim como todas as galectinas, Gal-4 não apresenta peptídeo sinal para transporte via retículo endoplasmático, sendo secretada para o meio extracelular por via não clássica (CAO; GUO, 2016). Dessa forma, Gal-4 pode ser encontrada tanto intracelularmente quanto extracelularmente, na superfície celular e na circulação (HUFLEJT; LEFFLER, 2003). Assim como descrito para Gal-1, a Gal-4 é expressa diferentemente por diversos tecidos, tanto normais como patológicos (BRINCHMANN; PATEL; IVERSEN, 2018; CAO; GUO, 2016), e participa de vários processos biológicos. Gal-4 desempenha papel importante no controle da inflamação intestinal, gênese de tumores, regulação de células T e modulação de doenças metabólicas (HOKAMA et al., 2004; HU et al., 2019; KIM et al., 2013; MOLVIN et al., 2019; PACLIK et al., 2008; SATELLI et al., 2011).

1.10 Modulação de respostas imunológicas e reconhecimento de patógenos por Galectinas

Uma nova perspectiva para a compreensão da regulação da resposta imunológica e interação entre patógeno e hospedeiro é o estudo da interação entre proteína e carboidrato (VAN KOOYK; RABINOVICH, 2008). Estudos tem demonstrado o papel de Gal-1 no direcionamento de perfis de ativação de linfócitos T. O bloqueio da expressão de Gal-1 resultou em aumento da rejeição de tumor mediado por células T e aumento na produção de citocinas de perfil Th1 (RUBINSTEIN et al., 2004). Outros estudos demonstraram o papel de Gal-1 em doença autoimune e rejeição fetal mediada por células T. Foi observado que camundongos deficientes em Gal-1 (Lgals1$^{-/-}$) apresentaram aumento de resposta Th1 e Th17 (BLOIS et al., 2007; TOSCANO et al., 2007). Ainda, outro grupo demonstrou o papel de Gal-1 na diferenciação de células dendríticas (DCs) com funções reguladoras. A adição exógena de Gal-1 ou a regulação endógena de Gal-1 atenuou respostas Th1 e Th17 e suprimiu inflamação autoimune através da produção de IL-27 e IL-10 (ILARREGUI et al., 2009).

As galectinas podem se ligar à glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos e ativar respostas imunológicas. Gal-3 liga-se a diversos patógenos, incluindo *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida Albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010; KOHATSU et al., 2006; MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2002; QUATTRONI et al., 2012; VAN DEN BERG et al., 2004). Gal-1 e Gal-4 apresentam função de modulação da resposta imunológica e ligação a patógenos (HOKAMA et al., 2004; ILARREGUI et al., 2009; PONCINI et al., 2015; STOWELL et al., 2010; TOSCANO et al., 2007). Gal-4 e Gal-8 reconhecem e matam bactérias que expressam antígeno do grupo sanguíneo B, indicando um possível mecanismo de resistência para estes microorganismos em indivíduos do grupo sanguíneo B (STOWELL et al., 2010). Gal-1 se liga aos vírus Nipah, Influenza e HIV (LEVRONEY et al., 2005; MERCIER et al., 2008; OUELLET et al., 2005; YANG et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que *Trypanosoma cruzi* ativa um células dendríticas reguladoras através de um mecanismo dependente de Gal-1 (PONCINI et al., 2015).

São escassos os achados sobre galectinas e *Leishmania* sp. Já foi demonstrado o reconhecimento de lipofosfoglicana (LPG) de *L. (L.) major* por Gal-3. A associação de Gal-3 a *L. (L.) major* cliva esta galectina, com consequente formação de uma Gal-3 truncada que

contém o CRD, mas não possui o domínio N-terminal crucial para a oligomerização e atividade biológica dessa lectina. Essa clivagem de Gal-3 específica por *L. (L.) major* também foi observada em macrófagos infectados, mostrando que essa clivagem pode regular as funções dependentes da oligomerização de Gal-3 no hospedeiro vertebrado a favor do parasito (PELLETIER; SATO, 2002). Também foi elucidado o reconhecimento de LPG de *L. (L.) major* por Gal-9, isto permite a ligação do parasita em macrófagos e consequente potencialização da invasão do parasita e infecção (PELLETIER et al., 2003). Ainda, o reconhecimento de Gal-3 é específico para os resíduos de poligalactose do LPG de *L. (L.) major*, enquanto que essa lectina não é capaz de reconhecer *L. (L.) donovani* (PELLETIER et al., 2003; PELLETIER; SATO, 2002). Aparentemente, Gal-3 na infecção por *L. (L.) major* poderia atuar como DAMP favorecendo o recrutamento de neutrófilos e favorecendo o controle da infecção em camundongos (BHAUMIK et al., 2013; FERMINO et al., 2013; SATO et al., 2014). Por muitos anos foi um mistério a natureza do ligante de promastigotas de *Leishmania* no intestino do inseto vetor. Kamhawi e colaboradores identificaram uma proteína ligadora de carboidrato expressa no intestino do vetor que foi denominada PpGalec, uma galectina do tipo repetição em tandem. A análise estrutural desta galectina demonstrou a presença de dois distintos domínios de reconhecimento de carboidrato com aproximadamente 128 aminoácidos associados por uma região ligadora com 28 aminoácidos. Essa galectina foi descrita como o ligante de promastigotas procíclicas de *L. (L.) major* em *Phebotomus papatasi*, entretanto não foi capaz de se ligar a formas promastigotas metacíclicas (KAMHAWI et al., 2004; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Recentemente, foi descrita uma possível participação de Gal-3 na regulação da sinalização via Notch em células dendríticas promovendo alteração da polarização de células T e consequente aumento da suscetibilidade à infecção por *L. (L.) major* em modelo de infecção em camundongos de fundo genético BALB/c (FERMINO et al., 2016). Entre os fatores responsáveis pela polarização de células T $CD4^+$, as citocinas são o estímulo com maior importância (LE GROS et al., 1990; SEDER et al., 1993). Entretanto, alguns trabalhos apresentam uma atividade imunorreguladora para galectinas, como é o caso de Gal-1 em câncer e doenças infecciosas, que apresenta propriedades anti-inflamatórias dependendo do microambiente e altera o padrão de citocinas produzidas pelas células T $CD4^+$ (CEDENO-LAURENT et al., 2012; ILARREGUI et al., 2009; PONCINI et al., 2015; RABINOVICH; TOSCANO, 2009; TOSCANO et al., 2007; VAN DER LEIJ et al., 2004). Uma melhor compreensão de vias imunomoduladoras é fundamental para futuros desenvolvimentos de

tratamentos ou aperfeiçoamento de tratamentos para doenças infecciosas crônicas, como no caso da LT causada por *L. (L.) amazonensis*.

Finalmente, justificamos o estudo concomitante das galectinas 1 e 4 na evolução da leishmaniose experimental com base em alguns dados da literatura. Apesar de vários relatos demonstrarem as atividades microbicidas e/ou o potencial efeito terapêutico destas duas galectinas (ARASU et al., 2017; CHEN et al., 2019a; EL-ASHRAM et al., 2017; LAAF et al., 2018), até o momento não existem relatos sobre a participação das galectina 1 e 4 na LT experimental. Além disso, a família das galectinas é conhecida com um modelo para estudos de diversidade intrafamiliar de proteínas em diferentes níveis (estrutural, expressão tecidual e funcional) (KALTNER et al., 2017).

Diante disso, o foco deste trabalho foi o estudo da participação destas duas galectinas na evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* em modelo murino *in vivo* utilizando as linhagens de camundongo BALB/c e C57BL/6 e *in vitro*. Mais especificamente, foi analisado se a deleção de Gal-1 (endógena) pode alterar o perfil de resposta imunológica nestes camundongos e a possível interação de Gal-1 e Gal-4 (exógenas) com moléculas do parasito, visando melhor compreensão da complexa interação patógeno-hospedeiro e possivelmente encontrar novos alvos terapêuticos e/ou diagnóstico para a LT.

Objetivo

2. OBJETIVO

Avaliar o papel de Gal-1 e de Gal-4 no desenvolvimento da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* em modelos *in vivo* e *in vitro*.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 selvagens (C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$), C57BL/6 deficientes em Gal-1 (C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$), BALB/c selvagens (BALB/c Lgals1$^{+/+}$), BALB/c deficientes em Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{-/-}$) fêmeas com idade entre seis e oito semanas. Os camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{+/+}$ foram criados no Biotério Geral da Prefeitura da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (Biotério PUSP/RP). Os camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram criados e mantidos no Biotério I da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). Durante o período de experimentação, os camundongos foram mantidos no Biotério I da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP). Os camundongos foram utilizados de acordo com as regras do Comitê de Ética desta universidade (aprovado pela comissão de ética no uso de animais da FCFRP, CEUA, Processo número 0081/2016).

3.2 Obtenção dos camundongos BALB/c deficientes em Gal-1

Para avaliar o papel de Gal-1 na evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* em modelo BALB/c, cruzamentos entre camundongos BALB/c e camundongos machos camundongos C57BL/6 deficientes em Gal-1 (C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$) para obtenção de camundongos BALB/c deficientes em Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{-/-}$). O sucesso da geração de camundongos BALB/c deficientes para Gal-1 foi acompanhado pela genotipagem da região do gene Gal-1. Para genotipagem, foi isolado o DNA da cauda dos camundongos, sendo o DNA extraído pelo método de extração de *salting out*. O ensaio de PCR foi conduzido para amplificar o gene *LGALS1*. Para genotipagem de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ foram utilizados os iniciadores F-GEG1EX2 e R-GEG1EX2. E para genotipagem de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram utilizados os iniciadores F-G1KOUP e R-G1KODW (Tabela 1). A PCR foi realizada num volume total de 20 µL de reação contendo 1,0 µL de trifosfato de desoxinucleotídeo, 1,2 µL de $MgCl_2$ a 25 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (GE, EUA), 1,0 µL de cada iniciador, 2,0 µL de tampão para PCR (GE, EUA) e 1,0 µl de amostra de DNA. Esta reação foi incubada em termociclador (Eppendorf, Alemanha) ajustado para correr

a 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos cada compreendendo 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 66°C (iniciadores para camundongo Lgals1$^{+/+}$) ou 1 minuto a 65ºC (iniciadores para camundongo Lgals1$^{-/-}$), 2 minutos a 72ºC e uma extensão final a 72ºC durante 10 minutos.

Tabela1. Características dos oligonucleotídeos utilizados para deleção do gene *LGALS1*.

Oligonucleotídeo	Sequência	Amplicon (pb)	Temperatura de hibridização (ºC)
F-GEG1EX2 R-GEG1EX2	5'-CAGGTCTCCAAGCTGATGTC-3' 5'-CTCTTGGCGTCCGAGGCCAC-3	326	66
F-G1KOUP R-G1KODW	5'CCTTGCAAAGTCCAGTATTCTGC-3' 5'-ACCTGCGTGCAATCCATCTTG-3'	480	65

3.3 Cultivo de espécies de *Leishmania*

Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (5º dia de cultivo) das cepas de *Leishmania* descritas na Tabela 2 foram cultivadas em meio de cultura de Schneider's (Sigma-Co, St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (GIBCO), 100 U/mL de penicilina G potássica (USB Corporation Cleveland, OH, EUA) e 2% de urina masculina em frascos de cultura (Corning Incorporated, Corning NY-USA).

Tabela 2. Cepas de *Leishmania* utilizadas no estudo.

Cepa	Referência internacional	Forma clínica	Isolado de	Origem geográfica
L. (L.) amazonensis PH8	IFLA/BR/67/PH8	ND	*Lutzomyia flaviscutellata*	Brasil
L. (L.) infantum PP75	MHOM/BR/1974/PP75	LV	*Homo sapiens*	Brasil
L. (L.) tropica STRAIN OD	MHOM/SU/1958/STRAIN OD	LC	*Homo sapiens*	Azerbaidjão
L. (V.) guyanensis M4147	MHOM/BR/1975/M4147	LC	*Homo sapiens*	Brasil
L. (L.) mexicana BEL21	MHOM/BZ/1982/BEL21	LC	*Homo sapiens*	Belize
L. (L.) major LV39	MRHO/SU/59/P	ND	*Rhombomys* sp	Brasil
L. (L.) hertigi C8	MCOE/PA/1965/C8	LV	*Coendou* sp	Panamá
L. (V.) equatorensis LSP1	MCHO/EC/1982/LSP1	LV	*Choloepus hoffmanni*	Equador
L. (V.) colombiensis L1245	IGOM/PA/1985/E582.34	ND	*Lutzomyia gomezi*	Panamá
L. (V.) lainsoni M6426	MHOM/BR/1981/M6426	LC	*Homo sapiens*	Brasil

ND: não detectado; LV: LV; LC: Leishmaniose Cutânea.

3.4 Infecção experimental dos camundongos

Para a infecção, 1,0 x 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 em fase estacionária de crescimento que foram cultivadas em meio Schneider's a 10%, foram inoculadas intradermicamente na orelha esquerda dos camundongos, diluídas em salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,2 em um volume final de 10 µL.

3.5 Avaliação do desenvolvimento da lesão em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*

O desenvolvimento da infecção foi acompanhado através da mensuração do desenvolvimento da lesão. As orelhas infectadas e controle (não infectada) foram mensuradas semanalmente durante oito semanas utilizando um paquímetro (150 mm/6" DIGIMESS Instrumentos de Precisão). O tamanho da lesão foi obtido pela diferença entre a medida da orelha infectada e orelha controle.

3.6 Quantificação da carga parasitária por diluição limitante

Com o intuito de se determinar o parasitismo durante o curso da infecção, a orelha infectada e linfonodo drenante (linfonodo retromaxilar) foram coletados de forma asséptica em PBS. O número de parasitos presentes nos órgãos avaliados foi determinado pela técnica de diluição limitante (AFONSO; SCOTT, 1993) com algumas modificações. Resumidamente, os órgãos foram triturados por meio de dissociadores de tecido (Medcons, Becton Dickinson, São José, Ca, EUA) em um volume de 2,0 mL de meio de cultura Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal (GIBCO), 100 unidades/mL de penicilina G potássica (SIGMA) e 2% de urina humana masculina. Os medcons foram então lavados com 10 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi então centrifugada a 1540 x *g* por 10 minutos para a separação das células contendo os parasitos. O sedimento foi suspenso em 1,0 mL de meio e distribuído em placas estéreis de 96 poços, sendo dispostos 200 µL da suspensão por cavidade, em duplicata. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 20 µL e adicionada em outro poço contendo 180 µL de meio. Essa diluição de 1:10 foi feita doze vezes, sempre trocando as ponteiras de um poço para outro. A placa foi então incubada a 25ºC e a verificação do crescimento de parasitos feita após dez dias de cultura. O resultado foi expresso como média do $\log_{10}$ do título de parasitos + 1.

3.7 Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real (RT-PCR)

Os tecidos dos camundongos infectados foram submetidos à extração do DNA genômico utilizando o kit Illustra™ Tissue (GE, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA assim obtido foi eluído em água livre de nucleases, dosado em aparelho NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, EUA) e mantido a - 20°C. Para o controle positivo da reação utilizou-se uma amostra de DNA genômico promastigota de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 obtido a partir de cultura cultivada em meio de Schneider extraído da mesma maneira, a partir do qual é realizada uma diluição seriada em água livre de nucleases, para obter uma curva padrão de DNA de parasitos, com 10, 1, 0,1, 0,001, e 0,0001 ng/µL de DNA. A amplificação foi realizada em placa de reação rápida de 96 poços MicroAmp™ (0,1 mL) (Applied Biosistens, EUA) em um volume final de 12 µL usando 6 µL do reagente específico SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, EUA), 1,2 µL de uma solução de 10 µM de cada primer específico para o DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*, iniciador ssrRNA-F 5'-TACTGGGGCGTCAGAG-3' e iniciador ssrRNA-R 5'-GGGTGTCATCGTTTGC-3' (PRINA et al., 2007) em uma concentração final de 0,5 mM (sintetizado por Exxtend, Solução em Oligos), 10 ng de DNA genômico de cada uma das amostras e água livre de nuclease suficiente para perfazer o volume de 12 µl. Um sistema de PCR em tempo real StepOne ™ (Thermo Scientific, EUA) foi usado para obter os valores de CT (*threshold cycle*) com o software StepOne ™ v2.3 (Thermo Scientific, EUA). Resumidamente, a ativação da DNA polimerase de Thermophilus aquaticus (Taq-DNA polimerase) foi a 95ºC durante 15 minutos. O programa de PCR incluiu 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, hibridização a 54°C durante 25 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A emissão de fluorescência verde por SYBR Green foi medida na etapa final de alongamento. Subsequentemente, um programa de curva de fusão com uma medição contínua de fluorescência foi aplicado a partir de 70°C e terminando a 95°C (velocidade de rampa de 0,1 °C/seg).

3.8 Análise histopatológica do sítio da infecção e linfonodo drenante

As orelhas e linfonodos retromaxilares foram fixados em solução salina tamponada com formol (PBS/formol) a 10% por 24 horas a temperatura de 8ºC. Após o

tempo de incubação, os órgãos foram lavados em etanol 50% para retirar o formol. Em seguida, foi iniciada a etapa de desidratação em etanol de 80 a 95% seguida por incubação em etanol absoluto. A diafanização foi realizada em xilol e a inclusão do material foi feita em parafina. Foram realizados cortes com 6,0 µm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico por avaliação cega.

3.9 Dosagem de citocinas por ensaio de Milliplex®

Seis citocinas foram avaliadas: IFN-γ, IL-4, IL-10, IL12p70 e TNF-α pelo ensaio Milliplex com o kit Milliplex® (Merck Millipore). Estas citocinas foram quantificadas a partir de homogenato obtido de orelhas de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após oito semanas de infecção. O tecido auricular infectado foi mecanicamente triturado por meio de dissociadores de tecido conforme descrito no item 6. O sobrenadante dos tubos foi aliquotado e armazenado a - 80°C. Todas as amostras foram submetidas a apenas um congelamento e descongelamento antes do teste. Este homogenato foi processado de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Obtenção e purificação de Gal-1 recombinante humana

A Gal-1 (Gal-1) utilizada em nossos estudos foi obtida de culturas de bactérias (*Escherichia coli* cepa M-15) transformadas com plasmídeo PQU-50 contendo o gene completo da Gal-1 humana dimérica. As bactérias utilizadas foram cedidas, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings, chefe do Biochemistry Department da Medicine College da Emory University, Atlanta, Georgia - EUA. A indução da expressão desta proteína pelas bactérias foi feita com 0,5 mM de isopropil β-D-tiogalacto-piranozídeo (IPTG, Sigma-Aldrich) por quatro horas a 37ºC. Os sobrenadantes brutos das culturas de bactérias contendo a proteína foram lisados na presença de inibidores de proteases (Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche Diagnostics), β-mercaptoetanol (Merck), lisozima, DNAse e RNAse (Sigma-Aldrich). O sobrenadante do lisado bacteriano foi então centrifugado (10.000 x g) por 30 minutos à 4ºC. Em seguida, o sobrenadante obtido após a etapa de centrifugação foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose. O material resultante do lisado que não ficou retido na coluna de afinidade (material esse

denominado *flow-through*) foi armazenado para análise da qualidade do método de purificação. Já o material retido na coluna, que continha Gal-1, foi eluído com tampão de eluição contendo 14 mM de β-mercaptoetanol e 100 mM de α-lactose (Sigma-Aldrich). Esse processo cromatográfico foi monitorado por leitura de densidade óptica (280 nm) em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu). As concentrações protéicas das soluções de Gal-1 foram determinadas pelas absorbâncias em 280 nm NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, EUA), e estes valores foram convertidos para concentração (mg/mL) com o uso do coeficiente de extinção molar (8970 cm^{-1} M^{-1}) destas moléculas. As frações contendo Gal-1 purificada foram mantidas em tampão de eluição, uma vez que o β-mercaptoetanol e a lactose são necessários para a preservação da atividade da Gal-1 (CHO; CUMMINGS, 1995). Finalmente, as preparações purificadas de Gal-1 foram estocadas a -80ºC até o momento do uso. Após as etapas de produção e estocagem, as frações de Gal-1 foram alquiladas com o uso de iodoacetamida (Sigma-Aldrich, 200 mM para 12 mg de Gal-1) na presença de 100 mM de α-lactose por 24 horas a 4ºC, para manter a Gal-1 em um estado reduzido, o que auxilia na preservação de sua capacidade lectínica (WHITNEY; POWELL; SANFORD, 1986). As frações foram então repurificadas em coluna de exclusão molecular (PD-10 *Desalting column*, GE Healthcare) e incubadas por 4 horas a 4ºC sob leve agitação com 200 µL de polimixina B (Sigma-Aldrich), resina com alta afinidade por lipopolissacarídeos (LPS), a fim de se remover tais resíduos provenientes da etapa de purificação do lisado bacteriano, os quais poderiam levar à manifestação de efeitos biológicos indesejados não-relacionados à Gal-1 (SARTER et al., 2009). Em seguida, a suspensão de Gal-1 e polimixina B foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos e o sobrenadante recuperado. Por fim, após a etapa de remoção do LPS, as alíquotas de Gal-1 foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) para sua esterilização, aliquotadas e armazenadas a 4ºC para os posteriores experimentos.

3.11 Obtenção e purificação de Gal-4 recombinante humana

A Gal-4 (Gal-4) utilizada em nossos estudos foi obtida de culturas de bactérias (*Escherichia coli* cepa Rosetta) transformadas com plasmídeo PET28 contendo o gene completo da Gal-4 humana. As bactérias utilizadas foram cedidas, gentilmente, pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings, chefe do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Emory, Atlanta, Georgia - EUA. A indução da expressão desta proteína pelas bactérias foi feita com 0,1 mM de IPTG (Sigma-Aldrich) por 24 horas a 25ºC. Os

sobrenadantes brutos das culturas de bactérias contendo a proteína foram lisados na presença de inibidores de proteases (*Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail*, Roche Diagnostics), β-mercaptoetanol (Merck), lisozima, DNAse e RNAse (Sigma-Aldrich). O sobrenadante do lisado bacteriano foi então centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos à 4ºC. Em seguida, o sobrenadante obtido após a etapa de centrifugação foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose. O material resultante do lisado que não ficou retido na coluna de afinidade (material esse denominado *flow-through*) foi armazenado para análise da qualidade do método de purificação. Já o material retido na coluna, que continha Gal-4, foi eluído com tampão de eluição contendo 14 mM de β-mercaptoetanol e 100 mM de α-lactose (Sigma-Aldrich). Esse processo cromatográfico foi monitorado por leitura de densidade óptica (280 nm) em NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, EUA). As concentrações proteicas das soluções de Gal-4 foram determinadas pelas absorbâncias em 280 nm e estes valores foram convertidos para concentração (mg/mL) com o uso do coeficiente de extinção molar (37360 cm^{-1} M^{-1}) destas moléculas. As frações contendo Gal-4 purificada foram mantidas em tampão de eluição, uma vez que o β-mercaptoetanol e a lactose são necessários para a preservação da atividade da Gal-4. As frações foram então repurificadas em coluna de exclusão molecular (PD-10 *Desalting column*, GE Healthcare) e incubadas por 4 horas a 4ºC sob leve agitação com 200 µL de polimixina B (Sigma-Aldrich), resina com alta afinidade por lipopolissacarídeos (LPS), a fim de se remover tais resíduos provenientes da etapa de purificação do lisado bacteriano, os quais poderiam levar à manifestação de efeitos biológicos indesejados não-relacionados à Gal-4. Em seguida, a suspensão de Gal-4 e polimixina B foi centrifugada (300 x g, 10 minutos) e o sobrenadante recuperado. Por fim, após a etapa de remoção do LPS, as alíquotas de Gal-4 foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) para sua esterilização, aliquotadas e armazenadas a 4ºC para os posteriores experimentos.

3.12 PCR de colônia de bactéria *E. coli* produtora de Gal-4 humana recombinante

A Gal-4 (Gal-4) utilizada em nossos estudos foi obtida de culturas de bactérias *E. coli* cepa *Rosetta* transformadas com plasmídeo PET28 contendo o gene completo da Gal-4 humana. Foram selecionadas três colônias de bactérias que foram cultivadas em meio LB ágar suplementado com os antibióticos de seleção (25 µg/mL de kanamicina e 50 µg/mL de clorafenicol). Estas colônias foram submetidas diretamente a PCR utilizando

oligonucleotídeos para a região do promotor T7 do plasmídeo PET28 bactérias *E. coli* cepa Rosetta foram transformadas com plasmídeo PET28 contendo o gene *LGALS4*. O sucesso da transformação foi acompanhado por PCR seguida por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A PCR foi realizada num volume total de 25 µL de reação contendo 1,0 mM de trifosfato de desoxinucleotídeo, 3,0 mM de $MgCl_2$, 0,5 µL de Taq DNA polimerase (GE, EUA), 30 pMol de cada iniciador, 10 µL de tampão para PCR (GE, EUA) e uma colônia de bactéria como de amostra de DNA. Esta reação foi incubada em termociclador (Eppendorf, Alemanha) ajustado para correr a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos cada compreendendo 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 47°C, 1 minuto a 72ºC e uma extensão final a 72ºC durante 5 minutos.

3.13 Identificação de Gal-4 por Western blot

Foram utilizadas preparações de Gal-4hr purificada, material solúvel (sobrenadante) sem indução (sem IPTG), material solúvel com indução (com IPTG), material insolúvel (sedimento) sem indução, e material insolúvel com indução. Os lisados foram ressuspendidos em tampão de amostra contendo SDS (50 mM de Tris pH 6,8, 2% de SDS (*USB Corporation, USA*), 0,1% de azul de bromofenol (*Synth, USA*), 10% de glicerol (*USB Corporation*), 2,5% de β-mercaptoetanol). Em seguida, as proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 12% em condições redutoras e dissociantes. As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 µm (*GE Healthcare, USA*) utilizando o sistema de transferência sistema úmido a 35 volts, 300 mA por 60 minutos. Neste sistema foi utilizado tampão de transferência (50 mM de Tris, 40 de mM glicina e 10% de metanol). O sucesso da transferência foi verificado por coloração com Ponceau S 0,5%. As membranas foram bloqueadas por 16 horas a 6º C em tampão Tris (TBS – do inglês, *Tris buffered saline*) (25 mM de Tris, pH 7,4, 0,3 mM de KCl e 140 mM de NaCl) contendo 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membrana foram lavadas em TBS-T 0,05% (TBS 0,05% de Tween 20) e incubadas com anticorpo anti-Gal-4 humana (anticorpo policlonal produzido em coelho anti-Gal4 Thermo PA5-34836) na diluição 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em TBS-T 0,05% e incubadas por 1 hora a 25º C com anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (diluição 1:15000; *KPL, USA*). A detecção da reação foi realizada em sistema *ChemiDoc Imaging Systems* (Bio-Rad) através do kit de detecção ECL™ *Western Blotting Detection Reagents* (GE).

3.14 Obtenção de Gal-1 e de Gal-4 humana recombinantes derivatizadas com isotiocianato de fluoresceína

Para os ensaios de avaliação da ligação de Gal-1 e Gal-4 à superfície de *Leishmania*, alíquotas de Gal-1 alquiladas com iodoacetamida e alíquotas de Gal-4 foram submetidas à conjugação com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Pierce). Para isso, 1 mg de FITC foi diluído em tampão borato 0,67 M, pH 8,5, e 10 µL desta solução de FITC foram adicionados a 500 µL de uma solução de Gal-1 e a 500 µL de uma solução de Gal-4 em tampão fosfato (PBS – do inglês, *phosphate buffer solution*) de 1,0 mg/mL, na presença de 100 mM de α-lactose, a fim de impedir que o fluoróforo se conjugasse com resíduos de aminas livres no domínio de reconhecimento de carboidratos, podendo assim comprometer sua atividade lectínica. A solução obtida foi então mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por uma hora, e então submetida à cromatografia de exclusão molecular (PD-10 *desalting column*, GE Healthcare) para remoção de FITC e α-lactose da solução, e obtenção da Gal-1-FITC e de Gal-4-FITC purificadas. A preparação de Gal-1-FITC e de Gal-4-FITC foram posteriormente utilizadas em ensaio de ligação à superfície de *Leishmania* por citometria de fluxo.

3.15 Análise da atividade lectínica de Gal-1 e de Gal-4 recombinantes humana por ensaio de hemaglutinação

Após a derivatização de Gal-1 com iodoacetamida e purificação de Gal-4 em PD-10, o tratamento com polimixina-B para remoção de LPS, filtração para esterilização e/ou derivatização com FITC, a preservação da capacidade da Gal-1 e de Gal-4 de reconhecer glicanas (atividade lectínica) foi testada através de ensaio de hemaglutinação em placas de 96 poços. Gal-1 e Gal-4 ligam-se a superfície de eritrócitos humanos (CUMMINGS; LIU, 2009), formando uma “malha” de hemácias, que dessa maneira não se depositam no fundo do poço da placa de 96 poços de fundo em “U”. A aglutinação de hemácias humanas foi realizada na presença de diferentes concentrações de Gal-1, de Gal-4 e também na presença de carboidrato hapteno inibidor específico para estas galectinas, a α-lactose (20 mM ou 100 mM). A sacarose (20 mM ou 100 mM) foi usada como carboidrato-controle da reação de inibição da hemaglutinação, uma vez que Gal-1 e Gal-4 não apresenta afinidade relevante para essa molécula. As hemácias suspensas apenas em PBS, tampão utilizado no ensaio, ou apenas na

presença dos carboidratos lactose ou sacarose, foram consideradas o controle negativo de hemaglutinação. As soluções de Gal-1 e de Gal-4 foram diluídas (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078 µM) e 50 µL de cada uma foram adicionados à 50 µL de suspensão de hemácias humanas a 3% em PBS em placa de 96 poços com fundo em "U". A aglutinação das hemácias foi verificada após 2 horas de incubação. Após as etapas de derivatização e de confirmação da preservação da propriedade hemaglutinante de Gal-1 e de Gal-4, procedeu-se o armazenamento dessas preparações a 4ºC, até o momento do uso.

3.16 Marcação de Gal-4 com ^{99m}Tc

Foram dissolvidos 100 µg de Gal-4hr numa solução de 0,1 M de carbonato de sódio (pH 9,0) e uma solução recente de succinimidil-6-hidrazinopiridina-3-carboxilato (NHS-HYNIC, FutureChem, Corea) dissolvida em DMF seco que foi adicionado gota a gota a uma razão molar final HYNIC: Gal-4 de 20:1. A mistura foi então incubada à temperatura ambiente durante 60 minutos. Após este período, o NHS-HYNIC não marcado foi removido com uma coluna de Sephadex G-15 (GE Healthcare Life Sciences) e o eluído (Gal-4-HYNIC) foi recuperado com 0,1 M de acetato de amônio (pH 6,0). Para radiomarcação, em um frasco selado, Gal-4-HYNIC foi incubada com 50 µL de Tricina (20 mg/mL em solução salina, Sigma) e 25 µL de ácido N, N-Dietil etilendiaminodiacético (EDDA 40 mg/mL em solução salina, Sigma), como co-ligantes. Em seguida, 0,5 mL de solução de $^{99m}TcO^{-}_{4}$ (150 MBq) e 2,0 µl de solução de estanho (II) (2,0 mg de $SnCl_2$ em 100 µL de 0,1 N de HCl purgado com nitrogênio) foram adicionados a Gal-4-HYNIC e a mistura foi incubada durante 45 minutos à temperatura ambiente. O ^{99m}Tc livre foi removido com uma coluna Sephadex G-15 (GE Healthcare Life Sciences) e o eluído (Gal-4-HYNIC-^{99m}Tc) foi recuperado com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

3.17 Avaliação da eficiência da radiomarcação de Gal-4hr-^{99m}Tc

A pureza radioquímica foi determinada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Agilent 1260 - Brasil) com coluna de Proteína-Pak 125I-125A 10 µM 7,8 x 300 mm (Waters-USA) e vazão de 1,0 mL/min. A Gal-4hr foi detectada com o detector de radiação Gabi (Raytest-Alemanha) e a absorbância foi medida em 220 e 240 nm. A fase móvel consistiu em 50 mM de tampão fosfato, pH 7,0.

3.18 Aquisição de imagens por micro SPECT/CT

No dia do experimento, 37 MBq de Gal-4-HYNIC-^{99m}Tc foram injetados na veia lateral da cauda de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ saudáveis ou infectados com *L. (L.) amazonensis* cepa PH8. As imagens foram adquiridas 4 horas após a injeção, num sistema de imagem Albira microPET/SPECT/CT (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, EUA). As imagens do MicroSPECT/CT foram adquiridas sob anestesia geral (isoflurano/O_2) e aquecimento a 37°C. Os dados de imagem SPECT para cada camundongo foram registrados através de varredura estática, (uma varredura SPECT de 40 minutos - FOV 80 mm, seguido de uma tomografia de 10 minutos - FOV 80 mm, 35 kV, 400µA). As varreduras microSPECT/CT foram reconstruídas com o software Albira (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, EUA) com algoritmos de Maximização de Expectativa de Subconjuntos Ordenados (OSEM) e Projeção Filtrada para Trás (FBP), para SPECT e CT respectivamente. As imagens foram processadas com o software PMOD (PMOD Technologies, Zurick, CH).

3.19 Ensaio de ligação de Gal-1-FITC e Gal-4-FITC na superfície de espécies de *Leishmania*

Para avaliar a ligação de Gal-1-FITC e Gal-4-FITC à superfície de *Leishmania* sp. foram utilizadas 1,0 x 10^6 formas promastigotas totais em fase estacionária de crescimento, obtidas de cultura axênica. Os parasitos foram incubados com Gal-1-FITC e Gal-4-FITC por 1 hora em banho de gelo. O reconhecimento de moléculas na superfície de *Leishmania* sp. por Gal-1 e Gal-4 foram analisados por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCanto (BD Biosciences), e os dados fornecidos foram analisados pelo programa BD FACSDiva (BD Biosciences). Para determinar se a ligação de Gal-1 e de Gal-4 à superfície do parasita é dependente da interação lectina-carboidrato, lactose (20 e 100 mM) foi usada nos controles do experimento, uma vez que Gal-1 e Gal-4 tem alta afinidade para este carboidrato. Foi também utilizado como um controle negativo para ligação 20 mM de sacarose.

3.19 Ensaio de ligação dos domínios isolados de Gal-4 na superfície de *L. (L.) amazonensis*

Para avaliar qual domínio de Gal-4 seria importante para a ligação de Gal-4 à superfície de *Leishmania* sp. foram utilizadas 1,0 x 10^6 formas promastigotas totais em fase estacionária de crescimento, obtidos de cultura axênica. Os parasitos foram incubados com Gal-4-FITC, Gal-4-D1-FITC e Gal-4-D2-FITC por 1 hora em banho de gelo. O reconhecimento de moléculas na superfície de *Leishmania* sp. por Gal-1 e Gal-4 foram analisados por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCanto (BD Biosciences), e os dados fornecidos foram analisados pelo programa BD FACSDiva (BD Biosciences).

3.19 Avaliação da viabilidade de *L. (L.) amazonensis* após o tratamento com Gal-4

Para analisar se a interação direta de Gal-4hr com *L. (L.) amazonensis* poderia provocar a morte deste parasita foi realizado ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. Para isso, o ensaio foi conduzido em placa de 96 poços com 1,0 x 10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de Gal-4 (4,0; 2,0; 1,0 e 0,5 μM) em meio Schneider's 10% a 26ºC. O controle de vida (CV) foi incubado apenas com meio Schneider's 10%, o controle de morte foi tratado com 50 μM de Anfotericina B (Anf. B) por 24 horas a 26C. Em seguida, foi adicionado o MTT em cada poço na concentração de 0,5 mg/mL e a placa foi incubada por 4 horas em estufa a 26ºC. A placa foi centrifugada a 1811 x g por 15 min a 23ºC. O sobrenadante foi descartado e adicionado DMSO para solubilizar o sal formado. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em 570 nm. O controle de vida foi avaliado como 100% de viabilidade.

Paralelamente, foi conduzido ensaio para avaliar se Gal-4 induziria formação de poro na membrana do parasito. Para isso, o ensaio foi conduzido em tubo para citometria de fluxo com 1,0 x 10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram tratadas por 1 hora com diferentes concentrações de Gal-4 (8,0; 4,0; 2,0; 1,0 e 0,5 μM) em meio PBS em banho de gelo. Com o objetivo de avaliar o envolvimento da propriedade lectínica de Gal-4 sobre uma potencial ação desta lectina na viabilidade de células de *L. (L.) amazonensis*, 1,0 μM de Gal-4 foi testada na presença de 40 mM de lactose (carboidrato inibidor) ou na presença de 40 mM de sacarose (carboidrato não inibidor). Após os tratamentos, imediatamente antes da análise por citometria de fluxo, foram adicionados 2,0 μL de solução de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) na concentração de 1,0 mg/mL por tubo de análise. Ainda, células incubadas apenas com PBS, mantidas nas mesmas condições de tempo e

temperatura do ensaio (controle de vida, controle negativo), bem como células tratadas com 10 mM de H_2O_2 (controle de morte, controle positivo), foram utilizadas como controles negativo e positivo da incorporação de iodeto de propídeo, respectivamente. A incorporação de iodeto de propídeo pelas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* frente ao tratamento com Gal-4 foi analisada por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCanto (BD Biosciences), e os dados foram fornecidos e analisados pelo programa BD FACSDiva (BD Biosciences).

3.20 Avaliação morfológica de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com Gal-4

Para analisar se a interação direta de Gal-4hr com *L. (L.) amazonensis* poderia provocar alterações morfológicos no parasito. Para isso, o ensaio foi conduzido em microtubos de 1,5 mL contendo 1,0 x 10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 em fase estacionária de crescimento. Foi adicionado PBS ou 4,0 µM de Gal-4hr aos respectivos microtubos. Os microtubos foram incubados por 1 hora em banho de gelo. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 1870 x g, 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi fixado em paraformaldeído 2,5%. Os microtubos foram lavados duas vezes com PBS com as mesmas condições de centrifugação descritas acima. O sedimento foi ressuspenso em 1,0 mL de PBS, 100 µL desse conteúdo foi fixado em lâminas por centrifugação por 5 minutos a 500 rpm (rotações por minuto) em centrífuga Citospin. As lâminas foram fixadas com metanol e a coloração foi realizada com Kit Panótico, utilizando-se as recomendações do fabricante. As lâminas foram analisadas em microscópio de campo claro.

3.21 Extração e purificação de Lipofosfoglicana de *L. (L.) amazonensis*

As lipofosfoglicanas (LPG) de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 foram extraídas, purificadas e cedidas gentilmente pelo prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais (CPqRR/Fiocruz Minas). Brevemente, os parasitos em fase estacionária de crescimento foram lavados em PBS e centrifugados a temperatura ambiente por 7 minutos a 2100 x *g*. Para delipidação da amostra foram adicionados 2,5 mL da solução de clorofórmio/metanol (3:2) e 0,5 ml da solução de cloreto de magnésio a 4,0 mM. O material foi sonicado e centrifugado resultando em uma fase

sólida intermediária com a qual o procedimento foi repetido. Foram adicionados à fase sólida 2,5 mL da solução de cloreto de magnésio a 4,0 mM. O material foi sonicado e centrifugado para a extração de proteínas. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento repetido. Em seguida, foram adicionados 3,0 mL da solução de clorofórmio/metanol/água (10:10:3) e 0,5 mL da solução de clorofórmio/metanol (1:1) apenas na primeira etapa. O material foi submetido a três etapas de sonicação e centrifugação nas quais o sobrenadante contendo os fosfolipídeos de glicoinositol (do inglês, *glycoinositol phospholipids* - GIPLs) foi obtido. Para a extração do LPG foram adicionados 2,5 mL de ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/NH_4OH; 15:15:5:1:0,017) ao sedimento resultante que foi sonicado e centrifugado. O procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante contendo LPG foi obtido e, posteriormente evaporado utilizando-se nitrogênio em banho a 45ºC (Orlandi, 1987). Para purificação, a amostra contendo LPG foi solubilizada em 1,0 mL da solução ácido acético 0,1 N e cloreto de sódio 0,1 N, sonicada e submetida a uma cromatografia de interação hidrofóbica na qual a resina agarose-fenil foi utilizada. Aproximadamente, 2,0 mL de agarose-fenil foram aplicados em uma coluna Bio-Rad (#731-1550). A coluna foi lavada com seis volumes de acético 0,1 N e cloreto de sódio 0,1 N para empacotar a resina, de modo que o volume final após seu empacotamento estivesse entre 0,6 - 1,0 mL. Após o último mL de acético 0,1 N e cloreto de sódio 0,1 N penetrar na coluna, a amostra contendo LPG foi adicionada. Em seguida, o material foi lavado de acordo com a seguinte seqüência: 1,0 mL de acético 0,1 N e cloreto de sódio 0,1 N, 1 mL de ácido acético 0,1 N, 1,0 mL de água destilada e 4,0 mL de ESOAK utilizado para eluir o LPG. A amostra foi novamente evaporada com nitrogênio em banho-maria a 45ºC e, em seguida, solubilizada em 100 µL de água milli-Q e armazenada a 4º C (Soares *et al.*, 2002).

3.22 Ensaio de ligação de Gal-4 à lipofosfoglicana de *L. (L.) amazonensis*

Para avaliar a possível interação entre Gal-4hr e o LPG de *L. (L.) amazonensis* foi realizado um ensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay)*. Poços de placa de 96 poços foram sensibilizados com 5,0 µg de LPG purificado de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8, por 16 horas a temperatura de 8ºC. Em seguida, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina de soro bovino a 3% (BSA). A ligação foi avaliada pela adição de Gal-4 nas concentrações de 4,0; 1,0; 0,25 e 0,0625 µM. Com o objetivo de avaliar o envolvimento da propriedade lectínica de Gal-4 sobre uma potencial ligação desta lectina ao

LPG de *L. (L.) amazonensis*, 1,0 μM Gal-4 foi testada na presença de 20 mM de lactose (carboidrato inibidor) ou na presença de 20 mM de sacarose (carboidrato não inibidor). Como controle negativo de ligação foi utilizada Gal-1 nas concentrações de 4,0 e 1,0 μM, além dos açúcares controles (lactose e sacarose a 20 mM). A capacidade de ligação de Gal-4 ao LPG foi avaliada utilizando anticorpo monoclonal contra Gal-4 produzido em coelho (anticorpo caseiro) na concentração de 10 μg/mL. Seguida por revelação utilizando anticorpo comercial contra imunoglobulina de coelho conjugada com HRP na diluição de 1:5000 (*KPL, USA*). As placas foram lavadas e as soluções de substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e H_2O_2 foram adicionadas. Depois de 1 minuto, uma solução 2,0 N de ácido sulfúrico a foi adicionada, e a absorbância de cada poço foi mensurada em 450 nm por espectrofotômetro (SpectraMax - Molecular Device).

3.23 Preparo de macrófagos

3.23.1 Diferenciação de macrófagos a partir de precursores da medula óssea

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs - *bone marrow-derived* macrophages*)* foram diferenciados a partir de células extraídas de fêmures de camundongos BALB/c e C57BL/6 selvagens, BALB/c deficientes em Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{-/-}$) e C57BL/6 deficientes em Gal-1 (C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$). As células da medula óssea foram diferenciadas em meio R20/30 que compreende RPMI 1640 contendo 20% de SBF, 30% de meio condicionado de células L929, 15 mM de Hepes, 2 g de $NaHCO_3$, 100 U/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. As células foram mantidas em placas de petri de dimensões 90 x 20 mm (Corning Incorporated – NY, USA), a 37º C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. Depois de quatro dias foram acrescentados mais 10 mL do respectivo meio. Após sete dias de incubação, os macrófagos foram coletados através da lavagem das monocamadas com PBS gelado. As células foram plaqueadas em meio R10/5 que compreende RPMI contendo 10% de SBF e 5% de meio condicionado de células L929, e deixadas aderir por 24 horas antes de serem utilizadas nos experimentos.

3.23.2 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos elicitados por tioglicolato

Por via intraperitoneal, foram administrados 3,0 mL de solução de tioglicolato (Sigma-Aldrich) estéril a 3% (m/v) em camundongos BALB/c e C57BL/6 selvagens, BALB/c

Lgals1$^{-/-}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$. Após quatro dias, os camundongos foram devidamente anestesiados com solução de xilasina/ketamina (Dopalen Vetbrands/Dopaser Hertap Caller) (10 mg/kg + 100 mg/kg), e o exsudato peritoneal foi coletado pela injeção de cerca de 4 mL de PBS estéril gelado com auxílio de agulha e seringa estéreis. As células assim obtidas foram coletadas em tubo cônico de 50 mL e lavadas com PBS gelado (300 x g, 5 minutos, 4ºC), suspensas em meio RPMI completo, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas nas devidas concentrações em placas de culturas de células com 24 poços. Após 2 horas de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS para remoção das células não aderentes, e foram realizados os procedimentos de infecção. Em alguns experimentos, as células peritoneais obtidas foram plaqueadas sobre lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro, para que o material pudesse ser fixado e corado para posterior análise.

3.24 Tratamento dos macrófagos com Gal-4 recombinante humana e infecção experimental

Para avaliação do efeito da Gal-4 na infecção de macrófagos *in vitro*, placas de 24 poços contendo 2,0 x 10^5 macrófagos oriundos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$, foram tratados com Gal-4 na concentração de 4,0 ou 1,0 µM ou apenas meio RPMI. As células foram incubadas por uma hora a 37ºC, por uma hora a 5% de CO_2. Em seguida, o meio contendo os tratamentos foi retirado e lavado uma vez com PBS. Os parasitos então foram lavados em PBS (1000 x *g*, 10 minutos, 23ºC) e adicionados na proporção de 10 parasitos para cada célula em placa de 24 poços contendo 2,0 x 10^5 macrófagos oriundos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$. As placas foram incubadas novamente em estufa a 37ºC e 5% de CO_2 por três horas ou por vinte e quatro horas. Após esse período, o sobrenadante foi armazenado, os poços lavados duas vezes com PBS, fixados com metanol gelado por 20 minutos. As lamínulas contendo macrófagos foram submetidas à coloração com Panótico Rápido® (Laborclin), sendo expostas por um minuto em cada corante. Após lavagem com água e secagem, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com bálsamo. Os macrófagos assim corados foram fotografados em microscópio óptico invertido em aumento de 400x. A determinação da porcentagem de células infectadas, da média do número de amastigotas por célula e contagem diferencial foi realizada em 100 células totais fotografadas aleatoriamente.

3.25 Tratamento de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4 recombinante humana e infecção experimental

Para avaliação do efeito da Gal-4 na fagocitose de *Leishmania* e atividade leishmanicida de macrófagos, formas promastigotas totais em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8, obtidas conforme descrito no item 3, diluída em meio RPMI (ou apenas em meio RPMI com o mesmo volume de PBS utilizado para Gal-4) por uma hora em banho de gelo. Os parasitas então foram lavados em PBS (1000 x *g*, 10 minutos, 4ºC) e adicionados na concentração de 10 parasitos para cada célula em placa de 24 poços contendo 2,0 x 10^5 macrófagos oriundos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$, na presença de 4,0 μM ou 1,0 μM de Gal-4 ou apenas meio RPMI. As placas foram então incubadas novamente em estufa a 37ºC e 5% de CO2 por três horas ou por vinte e quatro horas. Após esse período, o sobrenadante foi armazenado, os poços lavados duas vezes com PBS, fixados corados e analisados conforme descrito no item 18.

3.26 Análise estatística

Os resultados estão representados como média e desvio padrão (SD). Para as comparações de grupos múltiplos, utilizou-se a análise de variância bidirecional (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças nos valores obtidos para dois grupos diferentes foram determinadas usando o teste T de Student. As análises foram realizadas usando o software Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de *P* igual ou menor a 0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da deficiência de Gal-1 no desenvolvimento da infecção experimental em camundongos de fundo genético C57BL/6

Já foi observado que a expressão de Gal-1, Gal-3 e Gal-4 apresenta variação de acordo com a linhagem de camundongo (MATHIEU et al., 2008). Isto ilustra que a escolha da linhagem (fundo genético) de camundongo para o estudo de galectinas pode influenciar nos resultados obtidos. Diante do exposto, avaliamos o desenvolvimento da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 (Figura 7) e BALB/c (Figura 10) deficientes ou não em Gal-1. Primeiramente, avaliamos a resposta de camundongos deficientes em Gal-1 no fundo genético C57BL/6 frente à infecção por *L. (L.) amazonensis*. Para isso, camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ foram infectados na orelha esquerda por via intradérmica com formas promastigotas totais de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento e o desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente, por oito semanas (Figura 7A e 7B). Não detectamos diferença no desenvolvimento da lesão na orelha em camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ quando comparados com camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ (Figura 7C). Ao final de 11 semanas de infecção foi feita quantificação do DNA do parasito no sítio da infecção e em linfonodos drenantes. Curiosamente, detectamos uma redução da carga parasitária no sítio da infecção em camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ quando comparados com camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ (Figura 8A), entretanto não foi possível detectar uma diferença significativa da carga parasitária em linfonodos drenantes quando comparados os dois grupos de camundongos (Figura 8B).

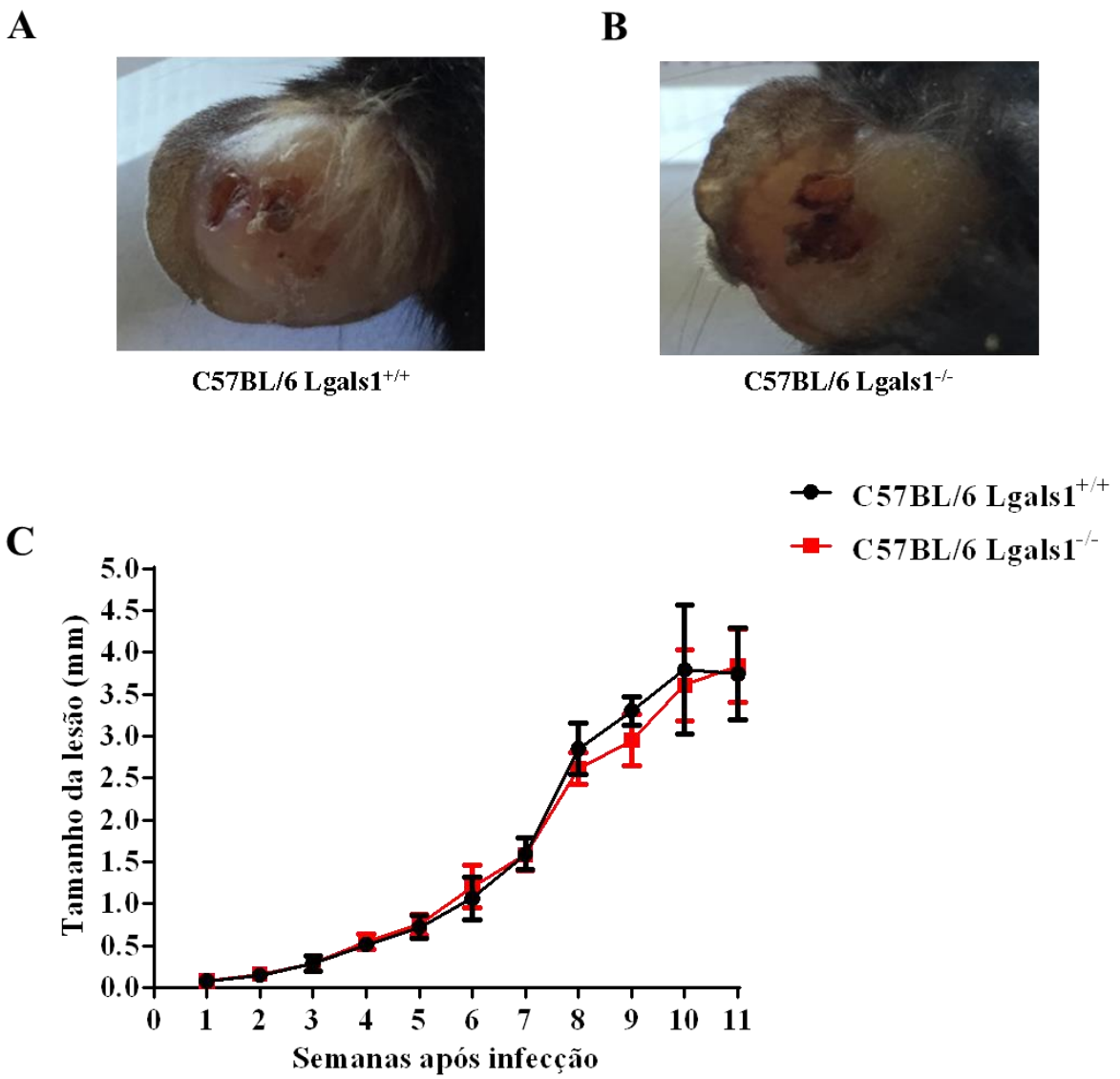

Figura 7. Cinética da evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$. Camundongos fêmeas C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ foram infectados, intradermicamente, com 1,0 x 10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 na orelha esquerda. Imagem representativa da lesão em orelha esquerda de camundongo C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ (A) e de camundongo C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ (B) após 11 semanas de infecção. (C) Cada ponto representa a média da diferença entre a orelha infectada e a orelha não infectada ± erro padrão (cinco animais por grupo). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Análise de variância (ANOVA) "two way" seguida por pós-teste de Bonferroni.

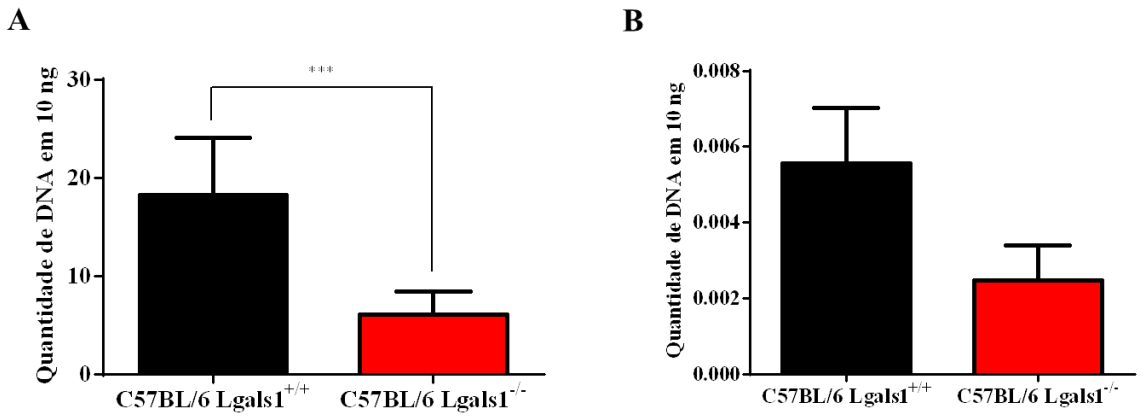

Figura 8. Carga parasitária da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$. Os resultados ilustram a quantificação da carga parasitária por PCR-RT. Camundongos fêmeas C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ foram infectados, intradermicamente, com 1,0 x 10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 na orelha esquerda. Cada barra representa a média da carga parasitária em cada grupo de camundongos ± erro padrão (cinco animais por grupo) após 11 semanas de infecção (A) Orelha; (B) Linfonodo retromaxilar. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. *** indica $P < 0,05$ análise de variância (ANOVA) seguida por pós-teste de Bonferroni.

4.2 Efeito da ausência de Gal-1 no desenvolvimento da infecção experimental em camundongos de fundo genético BALB/c

Para avaliar o papel de Gal-1 na evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* em modelo *in vivo* de suscetibilidade à Leishmaniose foram realizados cruzamentos entre camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (modelo de suscetibilidade) e camundongos machos da linhagem C57BL/6 deficientes em Gal-1 (Lgals1$^{-/-}$) com o objetivo de obter camundongos da linhagem BALB/c deficientes em Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{-/-}$). O sucesso da geração de camundongos da linhagem BALB/c deficientes em Gal-1 foi demostrado por genotipagem da região gênica da Gal-1. Inicialmente, a deleção do gene *LGALS1* em camundongos foi descrita por Poirier e Robertson em 1993, utilizando a estratégia de recombinação homóloga em células tronco embrionárias. A mutação projetada pelo grupo de pesquisadores resultou em uma deleção de uma região de 1,0 Kb do gene que engloba o exon 2, e a substituição desta sequência pela cassete neo (K7-neo) de 1,1 Kb contendo um códon de parada e um sinal de adição de cauda poli (A). Além disso, como o exon 2 codifica 27

aminoácidos da proteína Gal-1 e inclui a região do Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD), a qual é responsável pela propriedade lectínica da Gal-1. Portanto, a eliminação deste exon resulta na perda de função desta proteína em reconhecer glicanas (POIRIER; ROBERTSON, 1993). Visando a identificação dos camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ gerados após sucessivos cruzamentos (oito gerações), foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos para genotipagem destes camundongos. As características dos iniciadores estão representadas na Tabela 1, no item *Materiais e Métodos*. Dessa forma, os camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram selecionados por reação em cadeia da polimerase utilizando um par de oligonucleotídeos (F-GEG1EX2 e R-GEG1EX2) que hibridiza com a região intrônica "upstream" ao exon 2 e o exon 2 inteiro do gene *Lgals1*, e outro par de oligonucleotídeos (F-G1KOUP e R-G1KODW) que hidridiza com a região do exon 1 e parte da região intrônica "upstream" ao exon 2, onde foi inserido o K7-neo para deleção do gene *Lgals1* (Figura 9A).

O sucesso da geração dos camundongos deficientes em Gal-1 foi demonstrado por PCR seguida de análise do produto amplificado por eletroforese. Após oito gerações de cruzamentos foram obtidos camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$. Camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ apresentaram o produto da PCR de 326 pb e camundongos Lgal1$^{-/-}$ apresentaram o produto de PCR de 480 pb (Figura 9B). Camundongos BALB/c Lgals1$^{+/-}$ apresentaram o produto de PCR de 326 pb e 480 pb (dado não apresentado). Os camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após oito gerações foram utilizados nos experimentos *in vivo*.

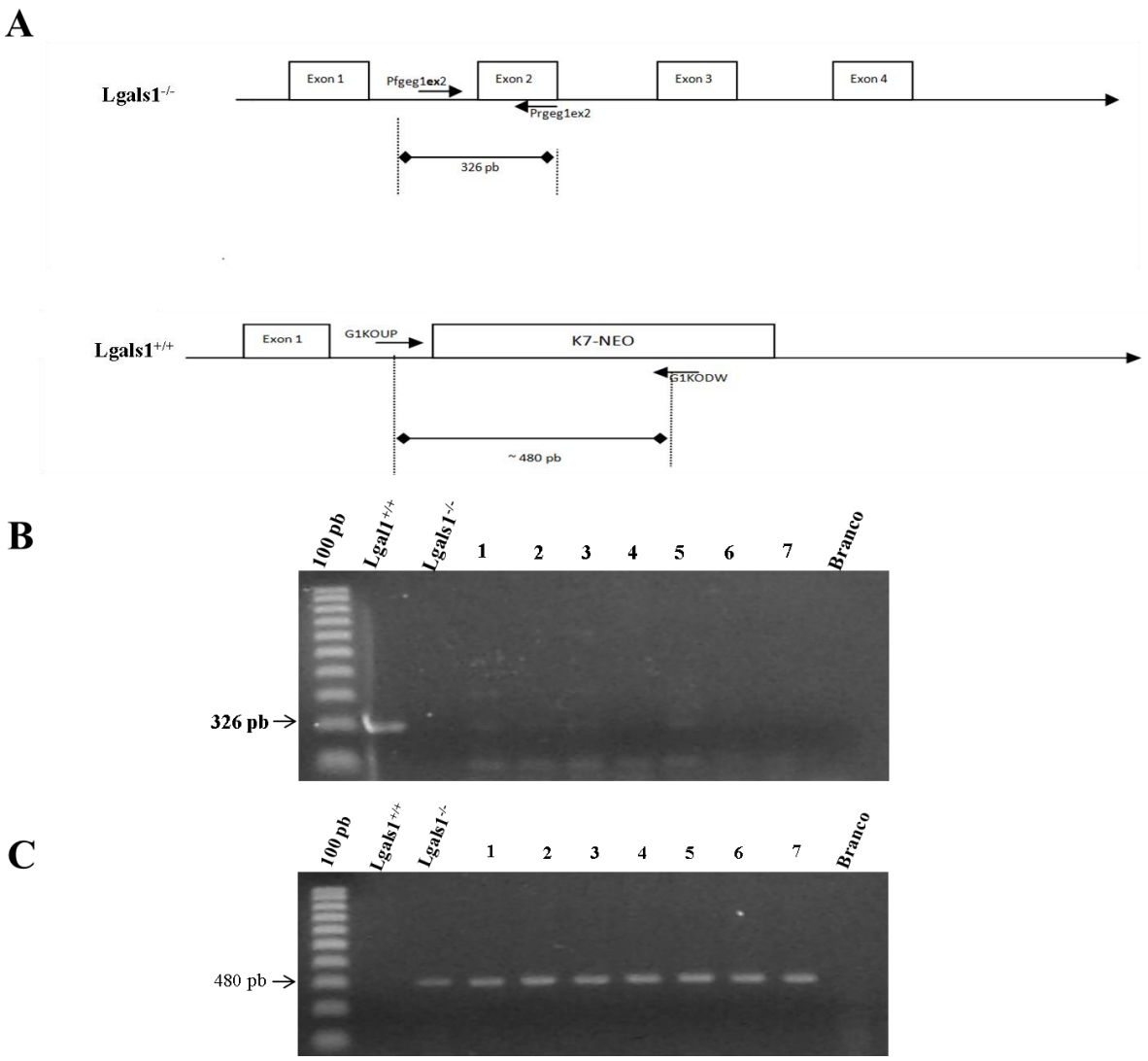

Figura 9. Estratégia de deleção do gene *LGALS1* em camundongos da linhagem BALB/c. Desenho esquemático da região de hibridização dos oligonucleotídeos utilizados para genotipagem de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$. Camundongos selvagens (Lgals1$^{+/+}$): região na qual os oligonucleotídeos F-GEG1EX2 e R-GEG1EX2 se hibridizam se o camundongo apresentar o gene da Gal-1 (Lgals1). Camundongos deficientes (Lgals1$^{-/-}$): região na qual os oligonucleotídeos G1KOUP e G1KODW hibridizam se o camundongo não apresentar o gene *LGALS1* (A). Análise de DNA da deleção do gene Lgals1 em camundongos BALB/c. A detecção do gene Lgals1 em camundongos selvagens e em camundongos homozigotos para a deleção do gene de interesse foi realizada em gel de agarose a 1% após reação de PCR. O produto amplificado de 326 pb é apenas nos camundongos Lgals1$^{+/+}$ (B) e o produto amplificado de 480 pb é encontrado apenas nos camundongos Lgals1$^{-/-}$ (C). 1 - 7: BALB/c Lgals1$^{-/-}$ que foi gerado por cruzamentos entre BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ durante oito gerações. Branco: controle negativo.

Visando compreender o papel de Gal-1 suscetibilidade à infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* nós avaliamos a infecção por este parasito em camundongos de fundo genético BALB/c deficientes ou não em Gal-1. Para isso, camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados na orelha esquerda por via intradérmica com formas

promastigotas totais de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento e a evolução da lesão foi acompanhada semanalmente, por oito semanas (Figura 10A e 10B). Nós detectamos que até a quinta semana após a infecção não houve diferença significativa entre os dois grupos de camundongo. Entretanto, a partir da sexta semana camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentaram um controle maior da infecção por *L. (L.) amazonensis* quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figura 10C), essa diferença se manteve até a oitava semana após a infecção quando os camundongos foram eutanasiados. Após oito semanas de infecção foi realizada a quantificação da carga parasitária em orelhas infectadas e linfonodos drenantes por ensaio de diluição limitante, como descrito no item *Materiais e Métodos*. Não detectamos diferença estatística, na carga parasitária das orelhas infectadas entre os dois grupos de camundongos (Figura 11A). Já os camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentaram menor carga parasitária em linfonodos drenantes quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figura 11B).

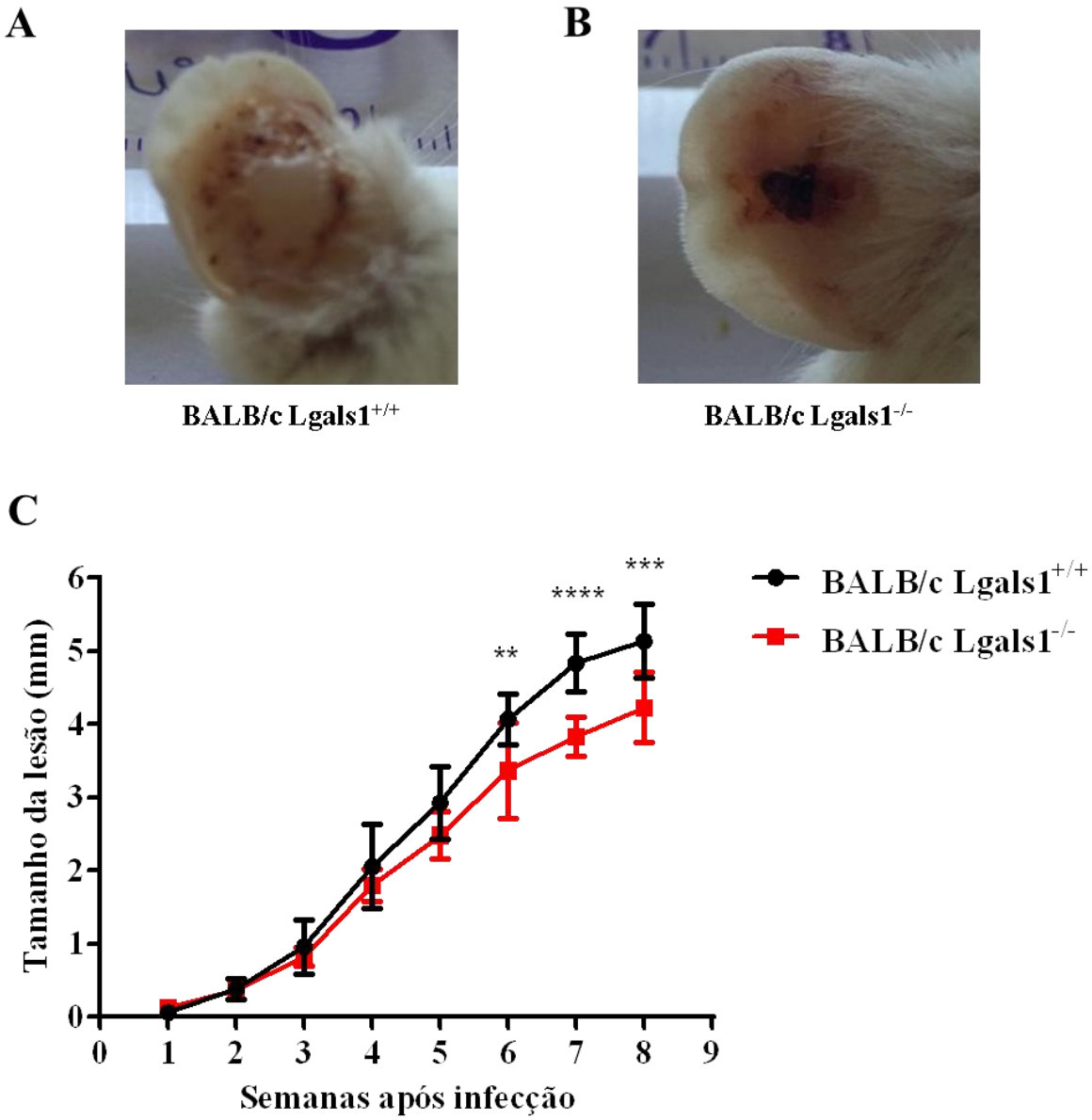

Figura 10. Cinética da evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$. Camundongos fêmeas BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados, intradermicamente, com 1,0 x 10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 na orelha esquerda. Imagem representativa da lesão em orelha esquerda de camundongo BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (A) e de camundongo BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (B) após oito semanas de infecção. (C) Cada ponto representa a média da diferença entre a orelha infectada e a orelha não infectada ± erro padrão (cinco animais por grupo). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. ** indica $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$ análise de variância (ANOVA) "two way" seguida por pós-teste de Bonferroni.

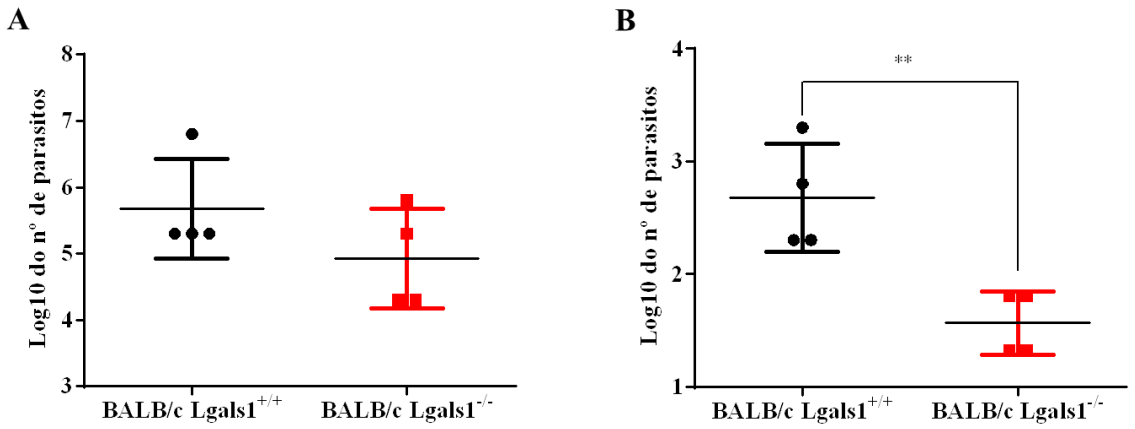

Figura 11. Carga parasitária da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$. Os resultados foram obtidos pela carga parasitária por diluição limitante. Camundongos fêmeas BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados, intradermicamente, com 1,0 x 10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 na orelha esquerda. Cada ponto representa o log da média da diluição + 1 onde foram detectados parasitos em cada camundongo ± erro padrão (cinco animais por grupo) após oito semanas de infecção. (A) Orelha; (B) Linfonodo retromaxilar. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. ** indica $P < 0,005$ análise de variância (ANOVA) seguida por pós teste de Bonferroni.

4.3 Efeito da deficiência de Gal-1 na restrição da infecção experimental em macrófagos

Avaliamos também a atividade fagocítica e leishmanicida de macrófagos deficientes ou não em Gal-1, uma vez que macrófagos são as principais células hospedeiras de *Leishmania* sp. (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Para isso, infectamos macrófagos (elicitados por tioglicolato e obtidos por lavado peritoneal ou obtidos por diferenciação de células precursoras da medula óssea, como descrito no item *Materiais e Métodos*) obtidos de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ com *L. (L.) amazonensis*. Em seguida, quantificamos a porcentagem de células infectadas e o número de amastigota por célula após 3, 24 e 48 horas de infecção (Figuras 12 e 13). Não detectamos diferença na capacidade de fagocitose em macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ (Figura 12A). Da mesma forma, a Figura 13A, ilustra a similaridade das capacidades fagocíticas em macrófagos de medula

óssea obtidos de C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$. Além disso, não houve diferença na quantidade de amastigota por células quando comparados macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ (Figuras 12B e 12C) e nem em macrófagos de medula óssea obtidos de C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ (Figuras 13B e 13C). Portanto, a ausência de Gal-1 endógena em macrófagos C57BL/6 não afeta a capacidade de fagocitose e controle da replicação do parasito nessas células.

Nós sugerimos que a ausência de Gal-1 em camundongos de fundo genético C57BL/6 não alterou a resposta à infecção experimental *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*, indicando que a ausência dessa proteína pode ser compensada por outros mecanismos na resposta contra a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

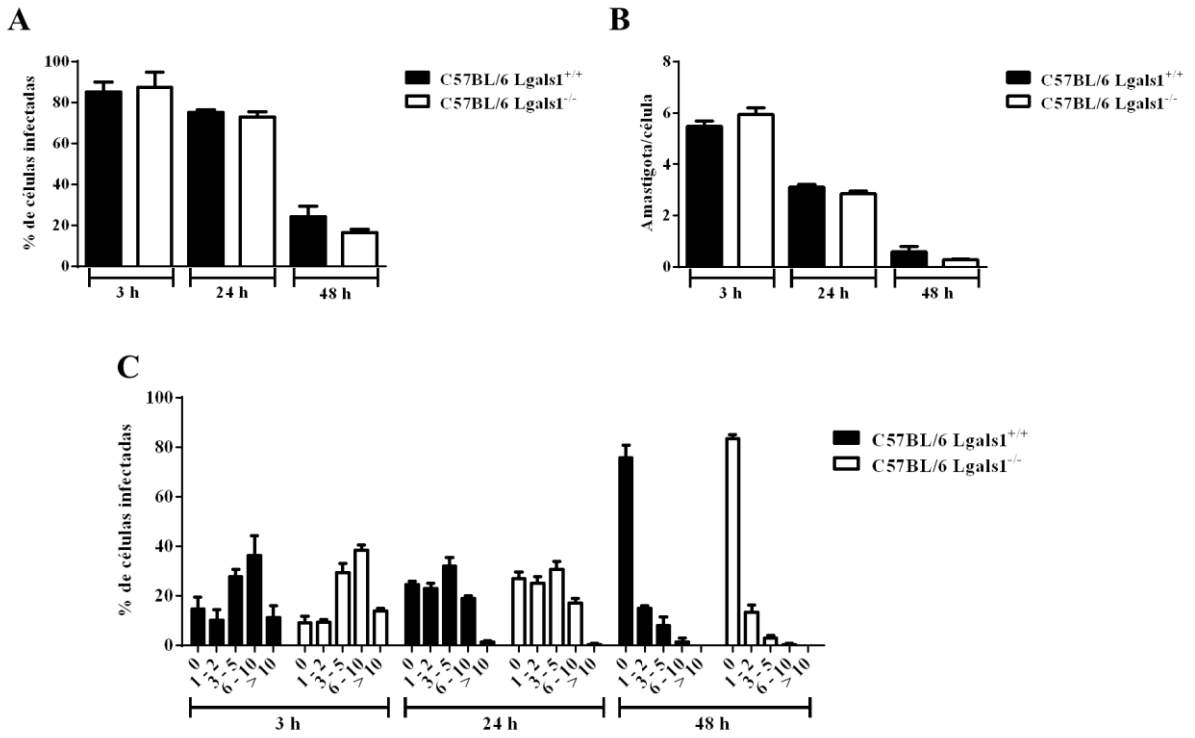

Figura 12. Avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida em macrófagos de camundongos C57BL/6 deficientes ou não em Gal-1. 2,0 x 10^5 macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ foram infectados com *L.(L.) amazonensis*. Foi realizada a coloração por Panótico e o número de amastigotas por célula foi quantificado por microscopia de campo claro. (A) Foi quantificada a porcentagem de células infectadas, (B) o número de amastigotas por célula e (C) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

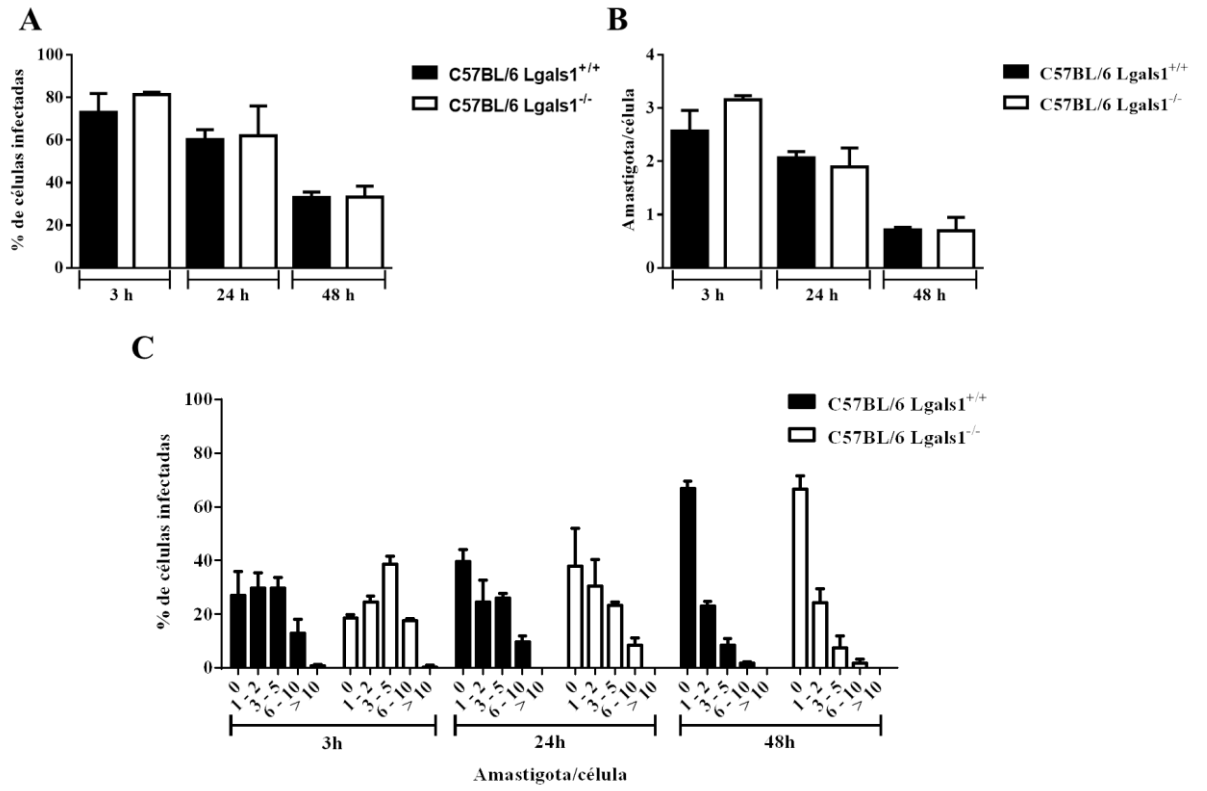

Figura 13. Avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida em macrófagos (BMDMs) de camundongos C57BL/6 deficientes ou não em Gal-1. 2,0 x 10^5 macrófagos obtidos de diferenciação a partir de precursos de medula óssea de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ foram infectados com *L.(L.) amazonensis*. Foi realizada a coloração por Panótico e o número de amastigotas por célula foi quantificado por microscopia de campo claro. (A) Foi quantificada a porcentagem de células infectadas, (B) o número de amastigotas por célula e (C) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula. BMDMs: macrófagos derivados de medula óssea. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Uma vez que demonstramos que a ausência de Gal-1 em camundongos de fundo genético BALB/c (BALB/c Lgals1$^{-/-}$) exerce efeito benéfico para o controle da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*, avaliamos também a atividade fagocítica e leishmanicida de macrófagos deficientes ou não em Gal-1. Para isso, infectamos macrófagos elicitados por tioglicolato e obtidos por lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e de BALB/c Lgals1$^{-/-}$ com *L. (L.) amazonensis* e quantificamos a porcentagem de células infectadas e o número de amastigota por célula após 3 e 24 horas de infecção. Para o período de 3 horas após infecção não detectamos diferença na capacidade de fagocitose em macrófagos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$, como indicado pelas porcentagens de células infectadas (Figura 14A) e pelas quantidades de amastigotas por células (Figura 14B e 14C). Portanto, a ausência de Gal-1 em macrófagos BALB/c não afeta a capacidade de fagocitose desses macrófagos. Entretanto, ocorreu uma redução na

porcentagem de células infectadas (Figura 14A) e quantidade de amastigota por células (Figura 14B e 14D) 24 horas após infecção em macrófagos obtidos de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ quando comparados à macrófagos obtidos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$. Dessa forma, sugerimos que a ausência de Gal-1 auxilia no processo de controle da replicação intracelular de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos, corroborando nosso dado obtido na infecção experimental em camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (Figuras 10 e 11).

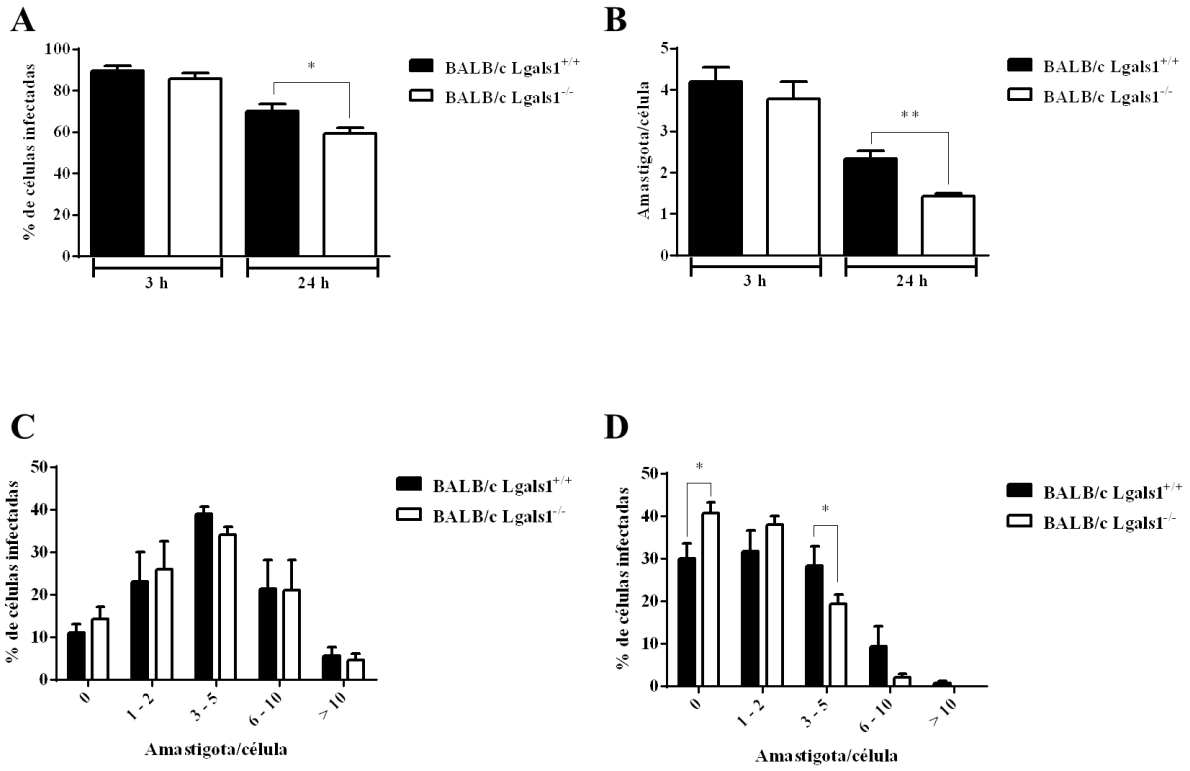

Figura 14. Avaliação da atividade fagocítica e leishmanicida em macrófagos de camundongos BALB/c deficientes ou não em Gal-1. 2,0 x 10^5 macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados com *L.(L.) amazonensis*. Foi realizada a coloração por Panótico e o número de amastigotas por célula foi quantificado por microscopia de campo claro. (A) Foi quantificada a porcentagem de células infectadas, (B) o número de amastigotas por célula, (C) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula após 3 horas de infecção e (D) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula após 24 horas de infecção. Os dados são representativos de um experimento. * indica $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ Teste T de Student (A e B) e análise de variância (ANOVA) seguida por pós teste de Bonferroni (C e D).

4.4 Análise histológica do sítio da infecção e de linfonodo drenante de camundongos BALB/c deficientes ou não em Gal-1

Para se avaliar o impacto da ausência da Gal-1 endógena sobre o dano tissular provocado no sítio da infecção realizamos uma análise histopatológica do tecido de orelha não infectada e de orelha infectada de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$. A orelha contralateral foi utilizada como controle (orelha não infectada). Os cortes histológicos obtidos oito semanas após infecção por *L. (L.) amazonensis* foram corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscópio de campo claro. Nos cortes histológicos dos grupos controle notamos que a epiderme e a derme apresentam-se com aspecto usual (Figura 15). Os aspectos histológicos de orelhas não infectadas foram similares entre os camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figuras 15A e 15B) e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (Figuras 15C e 15D).

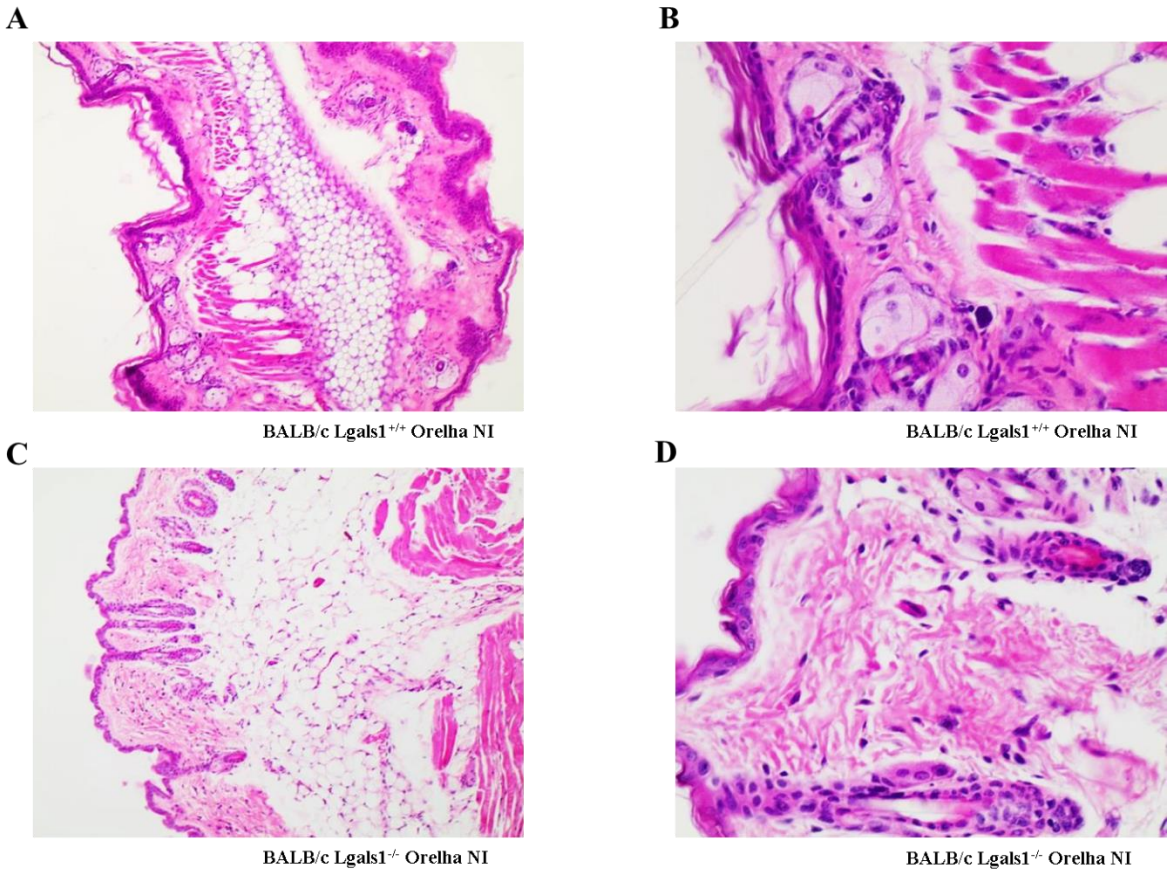

Figura 15. Perfil histopatológico de orelha de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ na ausência de infecção. As imagens correspondem a seções representativas de cortes de tecido de orelhas não infectadas coletadas, processadas, coradas por hematoxilina e eosina, e analisadas de três camundongos por grupo. Orelha não infectada de camundongo BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (A e B), orelha não infectada de camundongo BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (C e D). Aumento de 400 vezes (B e D). Os dados são representativos de um experimento.

Nos cortes histológicos de orelhas de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ após oito semanas de infecção foi detectado na derme a presença de agregados de células inflamatórias (Figura 16A), ricos em macrófagos xantomatosos, contendo no seu citoplasma grande quantidade de estruturas arrendondadas compatíveis com *L. (L.) amazonensis*, indicadas nas fotomicrografias por setas rosas em aumento de 400 vezes (Figura 16B e 16F). Também observamos espaços menos densos com vacúolos de gordura (Figura 16F). Eventualmente, observamos áreas de ulceração na epiderme sobrejacente indicado nas fotomicrografias por setas azuis em aumento de 200 vezes (Figura 16E).

Nos cortes histológicos de orelhas de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após oito semanas de infecção também detectamos na derme a presença de agregados de células inflamatórias (Figura 16C), com a presença de macrófagos contendo *L. (L.) amazonensis*, indicadas nas fotomicrografias por setas rosas em aumento de 400 vezes (Figura 16H). Além disso, observamos infiltrado inflamatório com predomínio de células linfocíticas (Figuras 16C e 16D). Eventualmente, também demonstramos áreas de ulceração na epiderme sobrejacente indicado nas fotomicrografias por setas azuis em aumento de 200 vezes (Figura 16G).

Este conjunto de resultados demonstra que a área de edema do sítio da infecção, mensurada semanalmente em ambos os grupos de camundongos, apresentou-se menor em camundongos deficientes em Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{-/-}$) quando comparados com camundongos que apresentam a expressão de Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{+/+}$). A análise histopatológica nos indicou que na ausência de Gal-1 há infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos. Além disso, não foi detectada diferença na quantidade de *L. (L.) amazonensis* nos cortes histológicos de ambos os grupos de camundongos analisados.

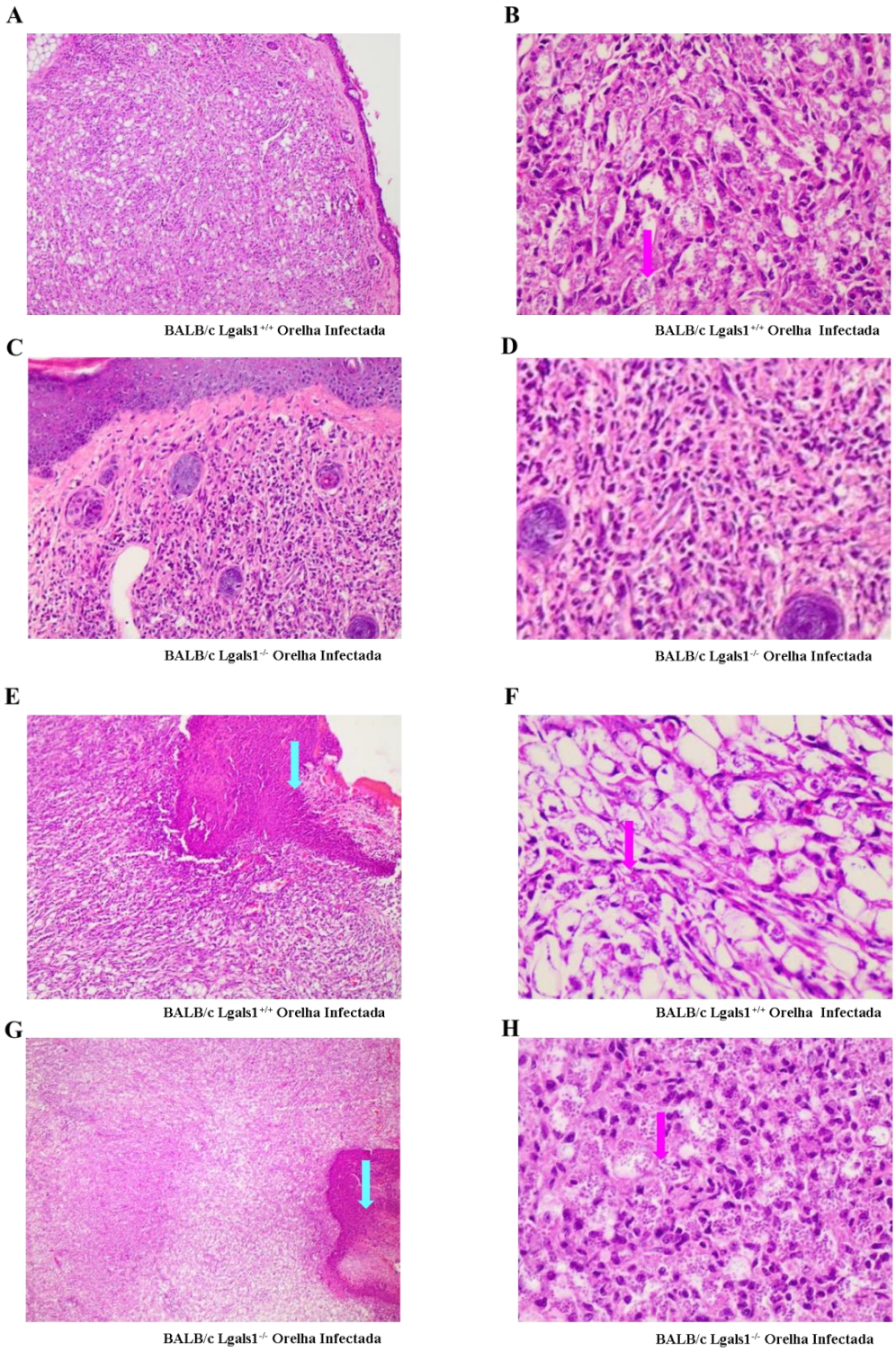

Figura 16. Perfil histopatológico de orelha de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Camundongos fêmeas BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados com *L. (L.) amazonensis*. As imagens correspondem a seções representativas de cortes de tecido de orelhas infectadas de três camundongos por grupo após oito semanas de infecção. Orelha infectada de camundongo BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (A, B, E, F), orelha infectada de camundongo BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (C, D, G, H). Aumento de 400 vezes (B, D, F, H), seta rosa indica presença de macrófagos contendo *L. (L.) amazonensis* (B, F, H). Aumento de 200 vezes (E, G), setas azuis indicam áreas de eventual ulceração na epiderme. Os dados são representativos de um experimento.

Avaliamos também o impacto da ausência da Gal-1 endógena sobre o dano tissular provocado no linfonodo drenante do sítio da infecção. Para isso, realizamos uma análise histopatológica do tecido de linfonodo retromaxilar na ausência de infecção e de linfonodo retromaxilar na presença de infecção em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após oito semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. O linfonodo retromaxilar contralateral foi utilizado como controle (linfonodo na ausência de infecção). Os cortes histológicos foram obtidos e analisados como descrito acima. Nos grupos controle notamos que os centros germinativos linfoides apresentam arquitetura intacta com aspecto usual, indicados nas fotomicrografias por setas amarelas (Figura 17). Além disso, não detectamos diferença no aspecto histológico de linfonodos na ausência de infecção em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figura 17A) e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (Figura 17B).

Nos cortes histológicos de linfonodos de ambos os grupos de camundongos infectados houve hiperplasia reacinonal. Nos cortes histológicos de linfonodos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ após oito semanas de infecção com *L. (L.) amazonensis* detectamos perda da arquitetura dos centros germinativos linfoides. A figura 18 (A e B) mostra que os folículos linfoides estão desfeitos e os linfócitos estão espalhados e entremeados por macrófagos. Também notamos a presença mais frequente de macrófagos nos linfonodos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ quando comparado com cortes histológicos de linfonodos de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$, conforme indicado nas fotomicrografias pelas setas verdes (Figura 18B).

No momento da coleta dos linfonodos após oito semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*, nós detectamos que os linfonodos de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentavam maiores em tamanho quando comparados com os linfonodos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (dado não apresentado). Nos cortes histológicos de linfonodos de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após oito semanas de infecção com *L. (L.) amazonensis* foi demonstrada a manutenção da arquitetura dos centros germinativos linfoides, indicado nas fotomicrografias por setas amarelas (Figuras 18C e 18D), fato que não ocorreu na presença da infecção em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figuras 18A e 18B). Além disso, não foi detectada o aumento de macrófagos nos linfonodos de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$.

Resumidamente, por meio de análise histopatológica em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ demonstramos uma hiperplasia reacional nos linfonodos. Entretanto, em camundongos deficientes em Gal-1 ocorre manutenção da arquitetura dos centros germinativos linfoides, enquanto que, em camundongos que expressam a Gal-1 essa

hiperplasia do linfonodo é acompanhada por perda da arquitetura dos centros germinativos linfoides e permeio de outras células imunológicas, como macrófagos na tentativa de controle da infecção.

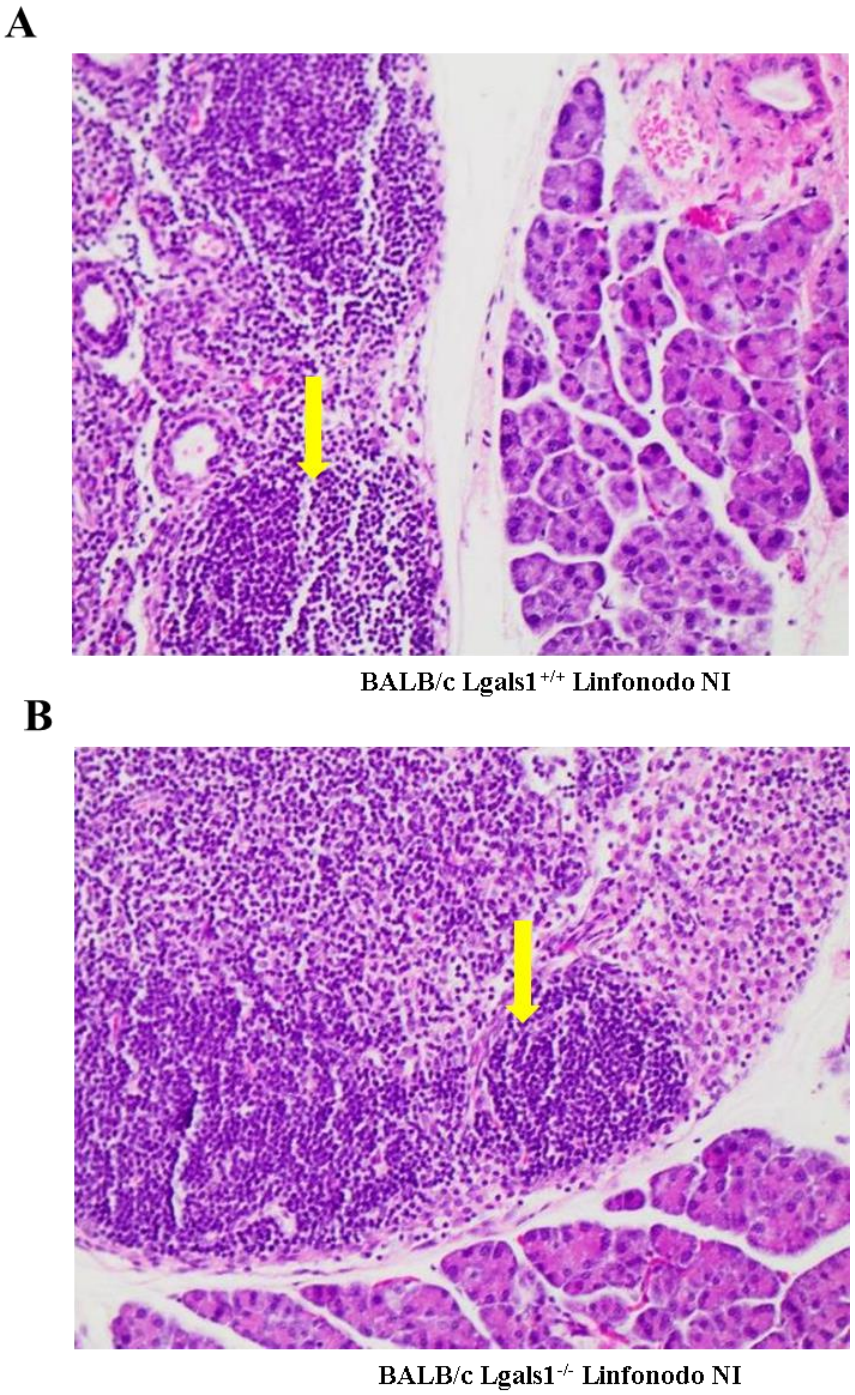

Figura 17. Perfil histopatológico de linfonodo drenante de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ na ausência de infecção. As imagens correspondem a seções representativas de cortes de tecido de linfonodo retromaxilar na ausência de infecção coletados, processados, corados por hematoxilina e eosina, e analisados de três camundongos por grupo. Linfonodo de camundongo BALB/c Lgals1$^{+/+}$ na ausência de infecção (A), linfonodo de camundongo BALB/c Lgals1$^{-/-}$ na ausência de infecção (B). As setas amarelas demonstram os centros germinativos linfoides com arquitetura usual preservada. Os dados são representativos de um experimento.

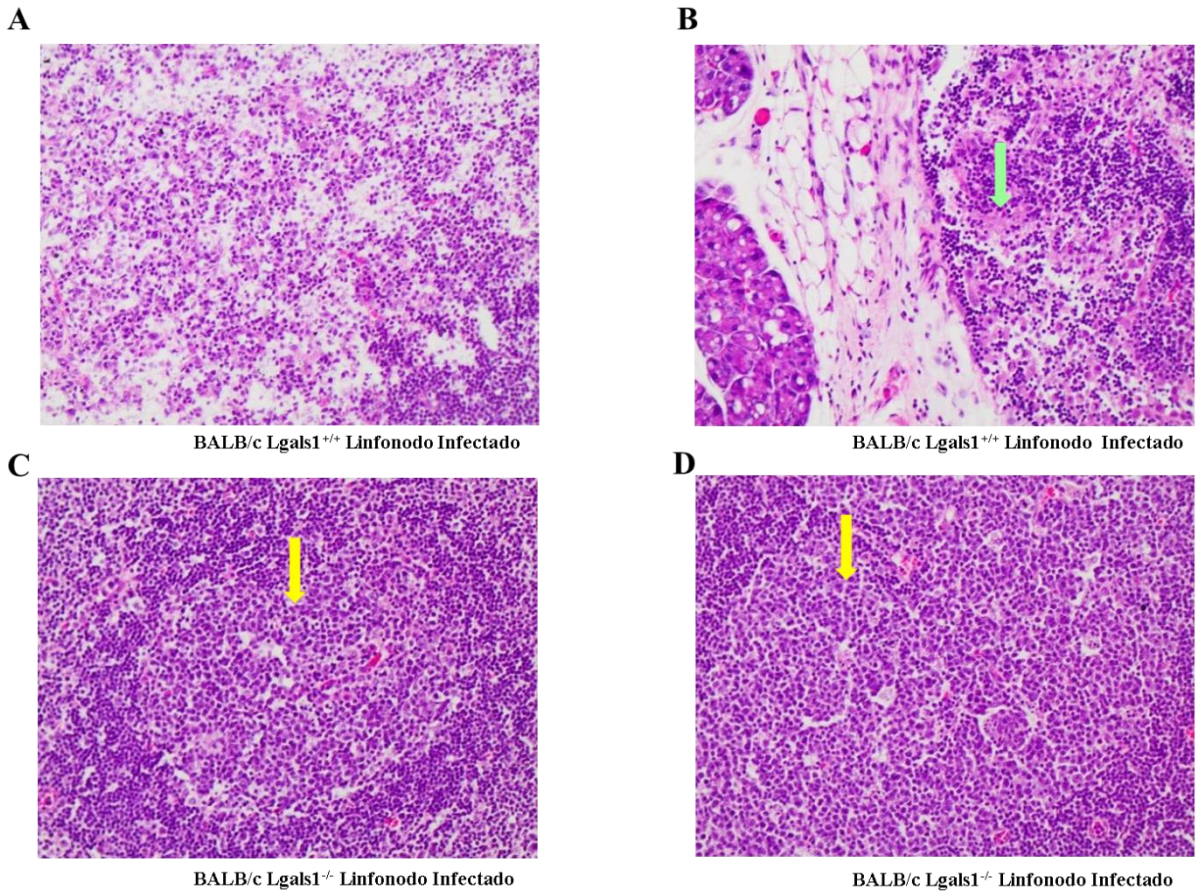

Figura 18. Perfil histopatológico de linfonodo drenante de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Camundongos fêmeas BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados com *L. (L.) amazonensis*. As imagens correspondem a seções representativas de cortes de tecido de linfonodo retromaxilar após oito semanas de infecção. Linfonodo de camundongo BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (A e B), linfonodo de camundongo BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (C e D). A seta verde demostra áreas em que há perda da arquitetura usual dos centros germinativos linfoides e presença frequente de macrófagos (A e B). As setas amarelas demonstram os centros germinativos linfoides com arquitetura usual preservada (C e D). Os dados são representativos de um experimento.

4.5 Análise do perfil de citocinas produzido após infecção com *L. (L.) amazonensis* no sítio da infecção e de linfonodo drenante de camundongos BALB/c deficientes ou não em Gal-1

Estudos tem demonstrado o papel de Gal-1 no direcionamento de perfis de ativação de linfócitos T, seja aumentando ou atenuando a resposta inflamatória (BLOIS et al., 2007; ILARREGUI et al., 2009; PONCINI et al., 2015; RUBINSTEIN et al., 2004; TOSCANO et al., 2007). Uma vez demonstrada a importância de Gal-1 na infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos de fundo genético BALB/c, nós avaliamos o impacto da

deficiência da Gal-1 endógena para o direcionamento de perfis de ativação de linfócitos T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), nestes camundongos, considerados susceptíveis à Leishmaniose experimental. As citocinas foram quantificadas em orelhas de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após oito semanas de infecção (Figura 19). Camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentaram maior produção de IFN-γ quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figura 19A). Além disso, detectamos uma menor produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF-α em camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figuras 19C, 19D, 19E e 19F). A Figura 19B ilustra que não houve diferença estatítica na produção de IL-1β quando comparados os dois grupos de camundongo. Em conjunto estes resultados sugerem que na ausência de Gal-1 ocorre um controle maior da infecção devido à modulação de citocinas pró e antinflamatórias contribuindo para redução da carga parasitária em camundongos de fundo genético BALB/c.

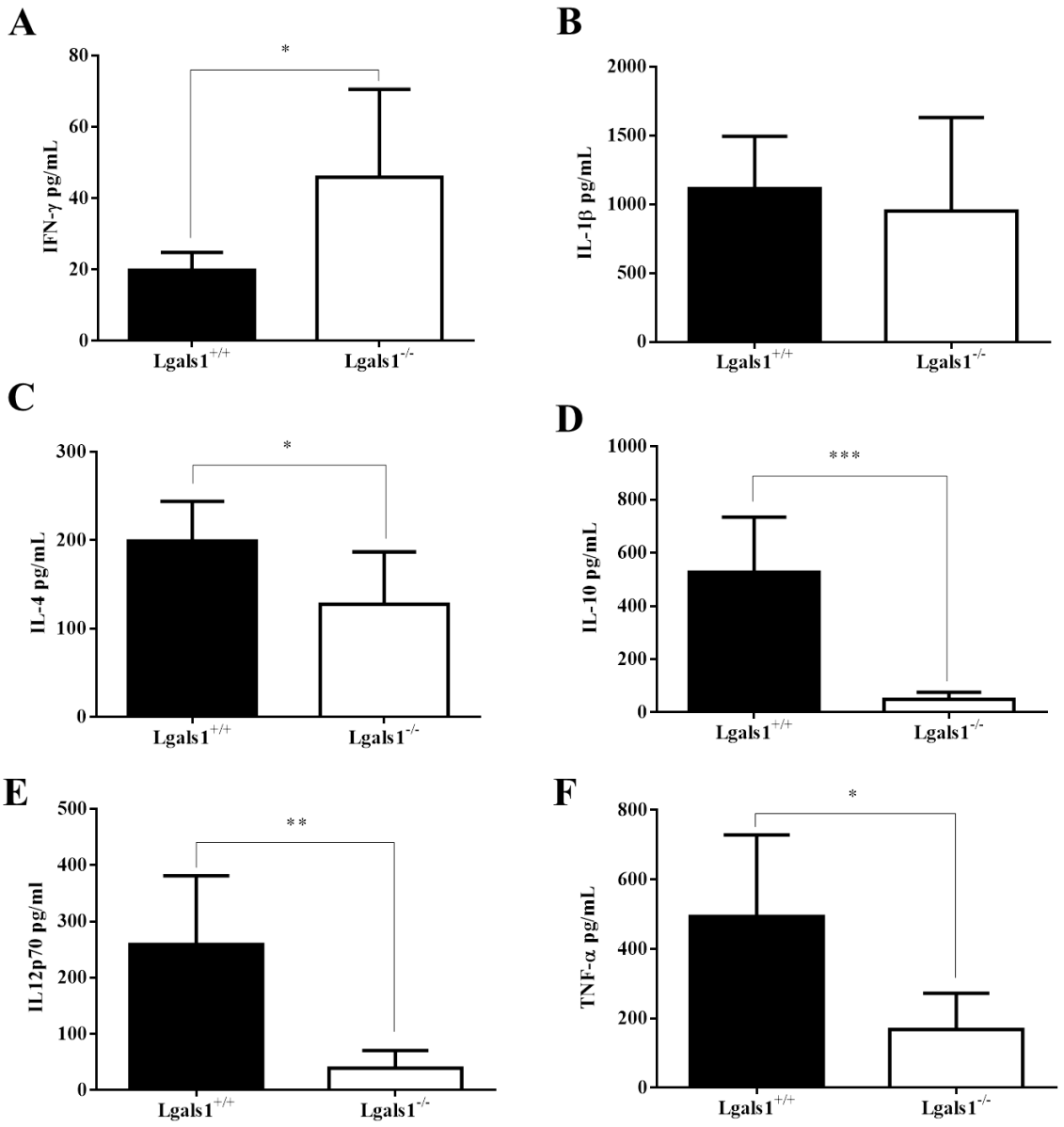

Figura 19. Perfil de citocinas no sítio da infecção em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis*. Camundongos fêmeas BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados com *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 na orelha esquerda. Quantificação de citocinas pelo ensaio de Milliplex na orelha infectada após oito semanas de infecção. (A) Dosagem de IFN-γ em pg/mL, (B) IL-1β em pg/mL, (C) Il-4 em pg/mL, (D) IL-10 em pg/mL, (E) IL-12p70 em pg/mL e (F) TNF-α em pg/mL. * indica $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$ Teste de T.

As mesmas citocinas foram quantificadas em linfonodo drenante do sítio da infecção de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ após oito semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis* (Figura 20). Camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentaram maior produção de IL-10 quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ (Figura 14D). Entretanto não detectamos diferença estatística na produção de IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF-α (Figuras 20A, 20B, 20C, 20E e 20F).

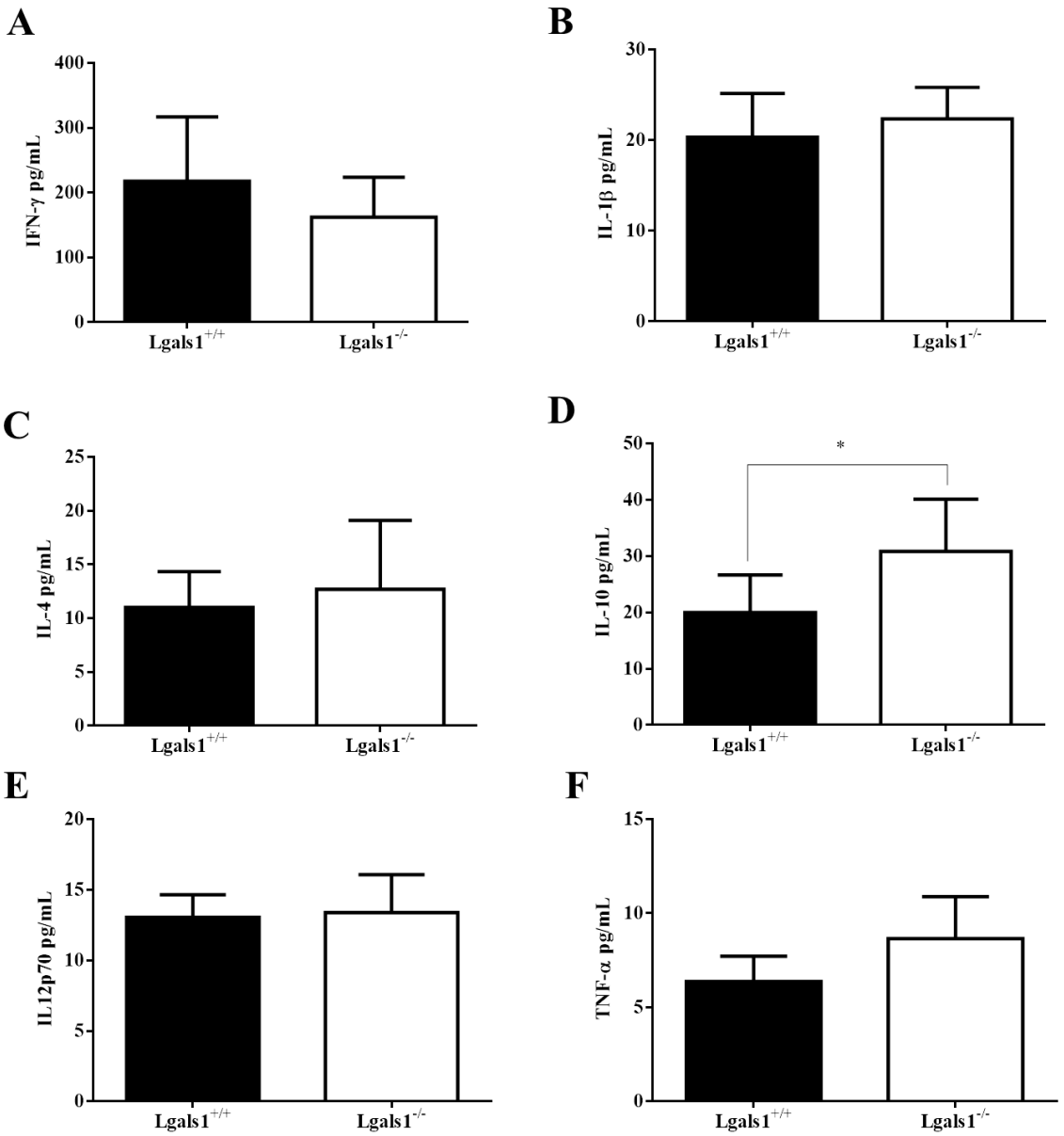

Figura 20. Perfil de citocinas no linfonodo drenante do sítio da infecção em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis*. Camundongos fêmeas BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram infectados com *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 na orelha esquerda. Quantificação de citocinas pelo ensaio de Milliplex em linfonodo retromaxilar esquerdo após oito semanas de infecção. (A) Dosagem de IFN-γ em pg/mL, (B) IL-1β em pg/mL, (C) Il-4 em pg/mL, (D) IL-10 em pg/mL, (E) IL-12p70 em pg/mL e (F) TNF-α em pg/mL.. * indica $P < 0,05$; Teste de T.

Dentro de uma perspectiva de análise conjunta da participação da Gal-1 e da Gal-4 na LT experimental, nesta etapa, demos continuidade ao trabalho por meio da investigação da Gal-4 neste processo infeccioso.

4.6 Obtenção e purificação de Gal-4 humana recombinante

A produção e purificação de Gal-4 humana recombinante (Gal-4hr) foram executadas com base em protocolos descritos por Rustiguel e colaboradores (RUSTIGUEL et al., 2016). Para isso, bactérias *E. coli* cepa Rosetta foram transformadas com plasmídeo PET28 contendo o gene *LGALS4*. O sucesso da transformação foi acompanhado por PCR seguida por eletroforese em gel de agarose. Os oligonucleotídeos escolhidos para a amplificação direta do material genético de colônias de bactérias hibridizam na região do promotor T7 de plasmídeos PET28, como ilustrado na Figura 21A. Após PCR utilizando oligonucleotídeos para o plasmídeo PET28 verificamos que o produto amplificado esperado de 1141 pb correspondente à 969 pb, região da Gal-4, somado a 171 pb, correspondente a sequência flanqueadora no gene de interesse foi detectado nestes clones de *E. coli* (Figura 21B, canaletas 1 a 3). O produto amplificado de 360 pb correspondente ao plasmídeo sem o inserto foi detectado em clones que foram transformados com o plasmídeo sem o inserto, plasmídeo vazio (Figura 21B, canaletas 4 a 6). A partir do sobrenadante de extratos brutos obtidos de lisados de bactérias *E. coli* que foram transformadas com sucesso com o gene da Gal-4 e tratadas com o indutor de expressão gênica IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo), como descrito no item *Materiais e Métodos*, foi produzida e purificada a Gal-4 utilizada nos experimentos deste trabalho.

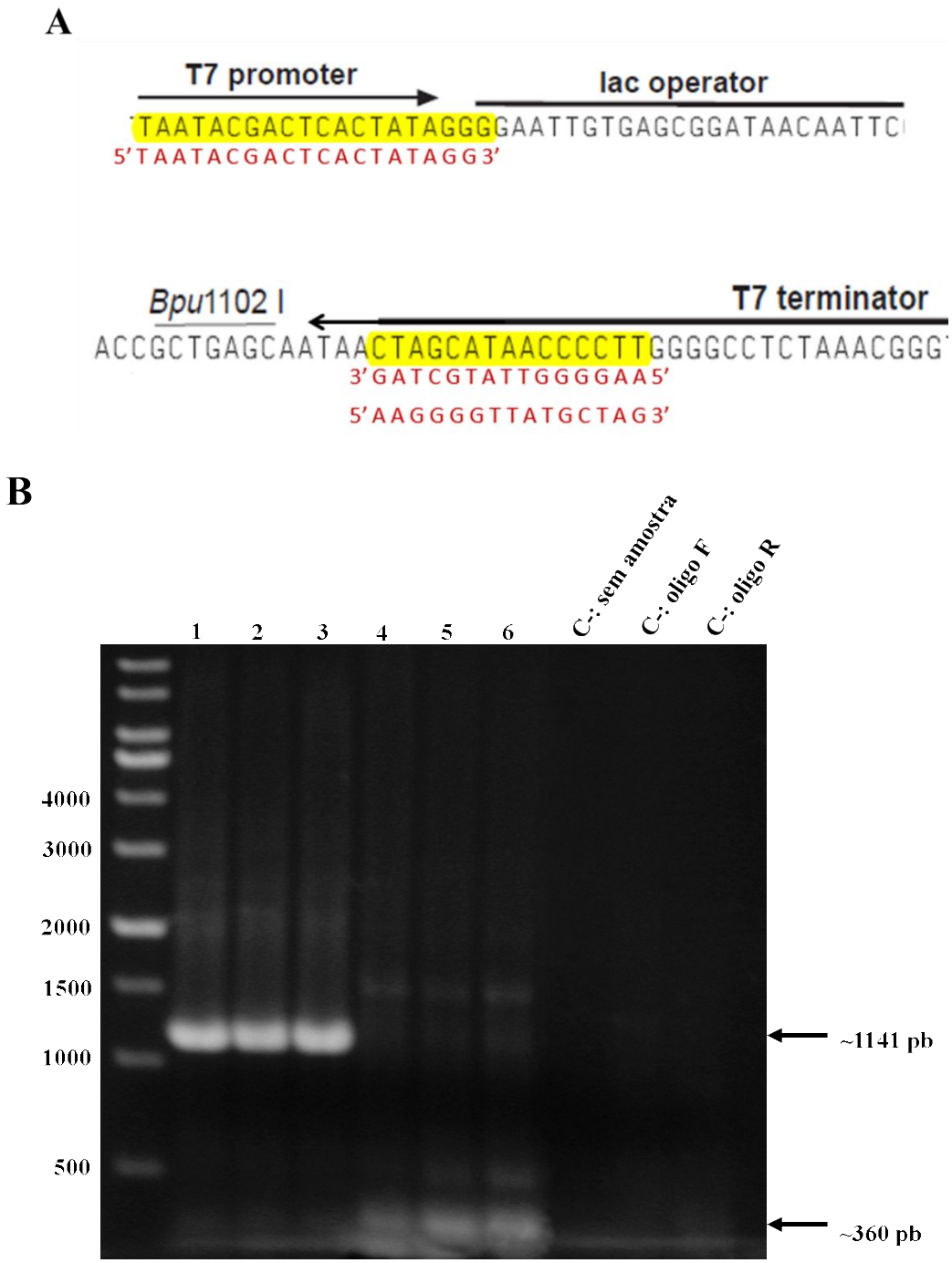

Figura 21. Confirmação da transformação bacteriana com o plasmídeo contendo o gene *LGALS4*. A Gal-4 (Gal-4) utilizada em nossos estudos foi obtida de culturas de bactérias *E. coli* cepa *Rosetta* transformadas com plasmídeo PET28 contendo o gene completo da Gal-4 humana. Foram selecionadas três colônias de bactérias que foram cultivadas em meio LB ágar suplementado com os antibióticos de seleção. Estas colônias foram submetidas diretamente a PCR utilizando oligonucleotídeos para a região do promotor T7 do plasmídeo PET28 (A). Produto amplificado de 1141 pb correspondente à 969 pb, região da Gal-4, e 171 pb, sequência flanqueadora no gene de interesse. Produto amplificado de 360 pb corresponde ao plasmídeo sem o inserto (B). 1 a 3: colônias de bactérias que contém o plasmídeo com o inserto do gene *Lgals4*, 4 a 6: colônias de bactéria que foram transformadas com o plasmídeo sem o inserto. C-: controle negativo. Oligo F: oligonucleotídeo *forward*. Oligo R: oligonucleotídeo *reverse*. Pb: pares de bases.

As preparações de Gal-4hr purificadas para utilização nos experimentos deste trabalho foram obtidas por cromatografia de afinidade em resina de agarose-lactose. A produção média da Gal-4hr purificada foi de 3,0 mg/L de cultura de bactérias. Acompanhamos o perfil da cromatografia de afinidade monitorando a absorbância em 280 nm das frações de 1,0 mL obtidas (Figura 22A). Considerando que a Gal-4hr perde sua capacidade de reconhecimento de carboidratos na ausência de seus ligantes e/ou agentes redutores (CUMMINGS; LIU; VASTA, 2017) as preparações de Gal-4hr purificada foram armazenadas a - 80°C em tampão de eluição (PBS acrescido de 100 mM de lactose e 14 mM de 2-mercaptoetanol (2-ME). Antes do uso, as preparações de Gal-4hr foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (*PD-10 Desalting Column*) para remoção da lactose e do 2-ME. Este procedimento foi acompanhado por leitura da absorbância em 280 nm (Figura 22B). Ao final deste procedimento, as preparações de Gal-4hr foram submetidas a cromatografia em colunas de agarose-polimixina B para remoção de LPS (lipopolissacarídeos), esterilizadas em membrana filtrante de 0,22 μm e estocadas à 4ºC até o momento do uso. Observamos que a Gal-4hr purificada, estéril e livre de LPS apresenta-se homogênea, pois foi possível detectar apenas uma banda proteica com massa molecular aproximada de 36 KDa (Figura 22C).

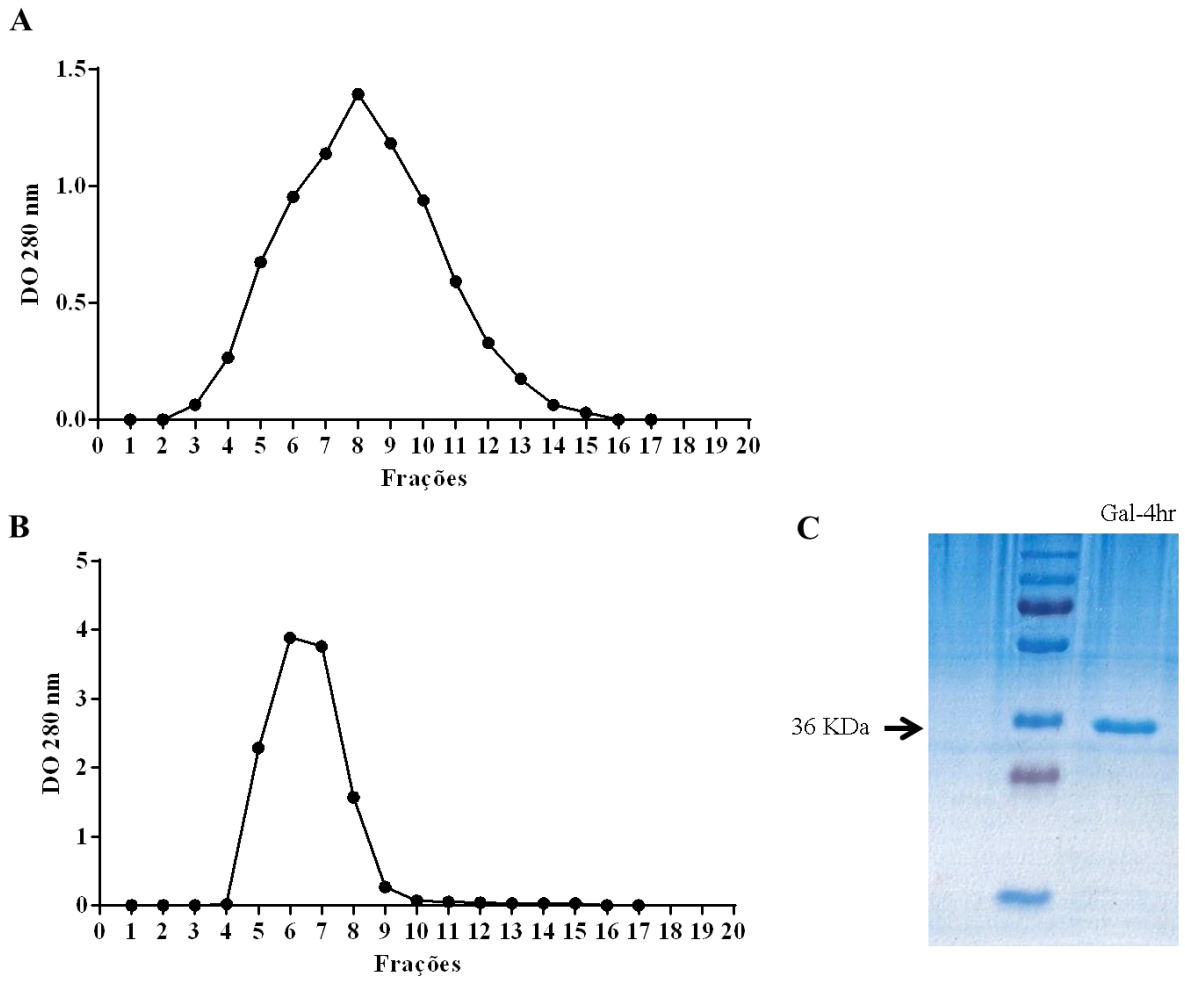

Figura 22. Perfil cromatográfico da purificação de Gal-4 humana recombinante do extrato bruto de bactérias por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A Gal-4hr foi purificada em duas etapas: cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A Gal-4hr purificada teve sua atividade lectínica preservada pelo uso de 100 mM de lactose e 14 mM de 2-ME em suas preparações. A remoção destes preservantes das preparações de Gal-4hr foi feita por cromatografia de exclusão molecular (PD-10), antes do uso experimental desta lectina. As frações cromatográficas foram monitoradas por absorbância em 280 nm. A concentração protéica das frações foram expressas em mg/mL. (A) Resina agarose-lactose; (B) exclusão por peso molecular em resina PD10; (C) Perfil eletroforético por SDS-PAGE em condições redutoras e dissociantes da Gal-4hr purificada.

A confirmação da atividade lectínica de Gal-4hr foi verificada por ensaio de hemaglutinação. Resumidamente, diferentes concentrações de Gal-4hr foram incubadas com suspensão de hemácias humanas a 3% em tampão PBS, na presença de 20 mM de lactose 20 (Figura 23, quarta linha), 20 mM de sacarose (Figura 23, terceira linha), e apenas Gal-4hr (Figura 23, primeira linha) por uma hora. Suspensões de hemácias somente com o PBS foram utilizadas como controles (Figura 23, segunda linha). A atividade lectínica desta proteína se comprova pela aglutinação das hemácias nos poços contendo de 10 a 0,31 µM de Gal-4hr na ausência de carboidratos ou na presença de sacarose. A preservação da atividade lectínica das

preparações homogêneas de Gal-4hr foi demonstrada pela sua capacidade de promover a aglutinação eritrocitária numa faixa de concentração entre 0,31 e 10 µM (Figura 23, primeira linha). A confirmação da participação do CRD da Gal-4hr nesta atividade hemaglutinante foi confirmada pela capacidade da lactose (carboidrato hapteno específico) inibir este efeito. O padrão de hemaglutinação da Gal-4hr na presença do carboidrato hapteno não-específico (sacarose) foi similar ao detectado na ausência de carboidratos. Isso ocorre devido capacidade de Gal-4hr reconhecer lactose por meio de seus CRDs, impedindo o reconhecimento de glicanas na superfície das hemácias, por esta galectina, fazendo com que as hemácias se depositem ao fundo do poço.

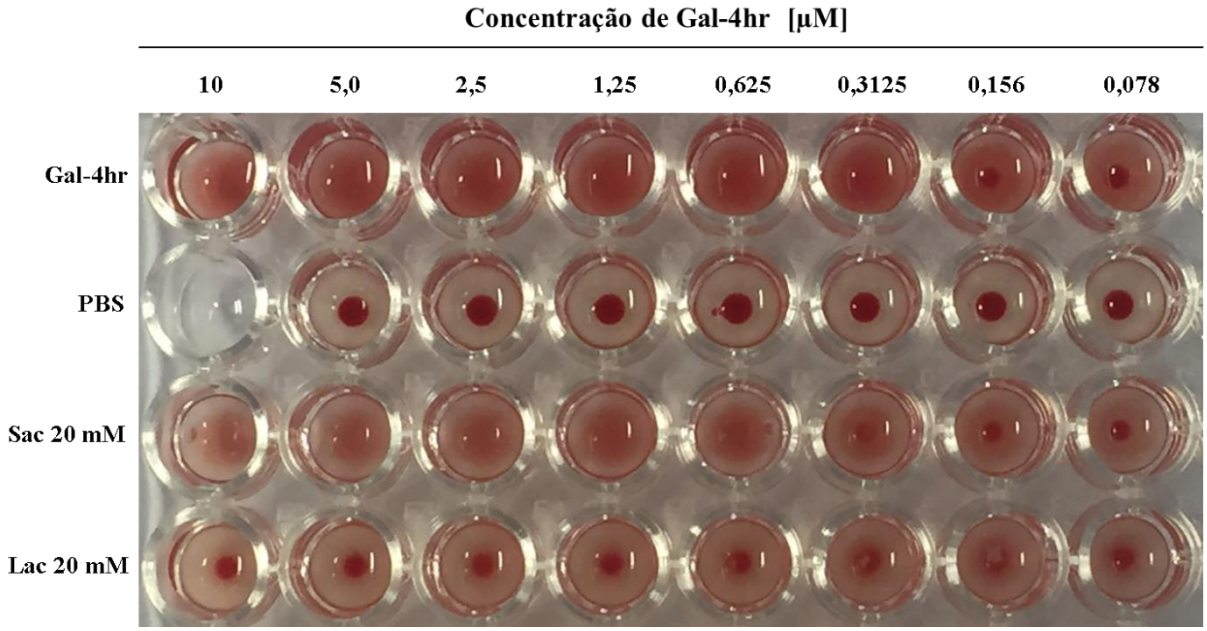

Figura 23. Atividade hemaglutinante das preparações de Gal-4. Após purificação, remoção de LPS e filtração em 0,22 µm, diferentes concentrações de Gal-4hr foram submetidas a ensaio de hemaglutinação na presença de lactose, sacarose e PBS. Sac 20 mM: sacarose a 20 mM. Lac 20 mM: lactose a 20 mM.

4.7 Obtenção e purificação de Gal-1 humana recombinante

As preparações purificadas de Gal-1 humana recombinante (Gal-1hr) foram obtidas com o uso de procedimentos previamente descritos (DIAS-BARUFFI et al., 2003). Basicamente, os sobrenadantes de lisados de bactérias *E. coli* transformadas com o gene da Gal-1 contido no vetor PQU-50 e tratadas com o indutor de expressão gênica IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) foram submetidos a cromatogradia de afinidade em resina de agarose-lactose. A produção média da Gal-1hr purificada foi de 30 mg/L de cultura de bactérias. Acompanhamos o perfil da cromatografia de afinidade monitorando a absorbância em 280 nm das frações de 1,0 mL obtidas (Figura 24A). Considerando que a Gal-1hr perde sua capacidade de reconhecimento de carboidratos na ausência de seus ligantes e/ou agentes redutores as preparações de Gal-1hr foram armazenadas a - 80°C em tampão de eluição (PBS acrescido de 100 mM de lactose e 14 mM de 2-mercaptoetanol (2-ME). Antes do uso, as preparações de Gal-1hr foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (*PD-10 Desalting Column*) para remoção da lactose e do 2-ME. Este procedimento foi acompanhado por leitura da absorbância em 280 nm (Figura 24B) e SDS-PAGE. A análise eletroforética das preparações de Gal-1hr mostrou um elevado grau de homogeneidade, uma vez que foi possível detectar apenas uma banda proteica com massa molecular aproximada de 15 kDa (Figura 24C).

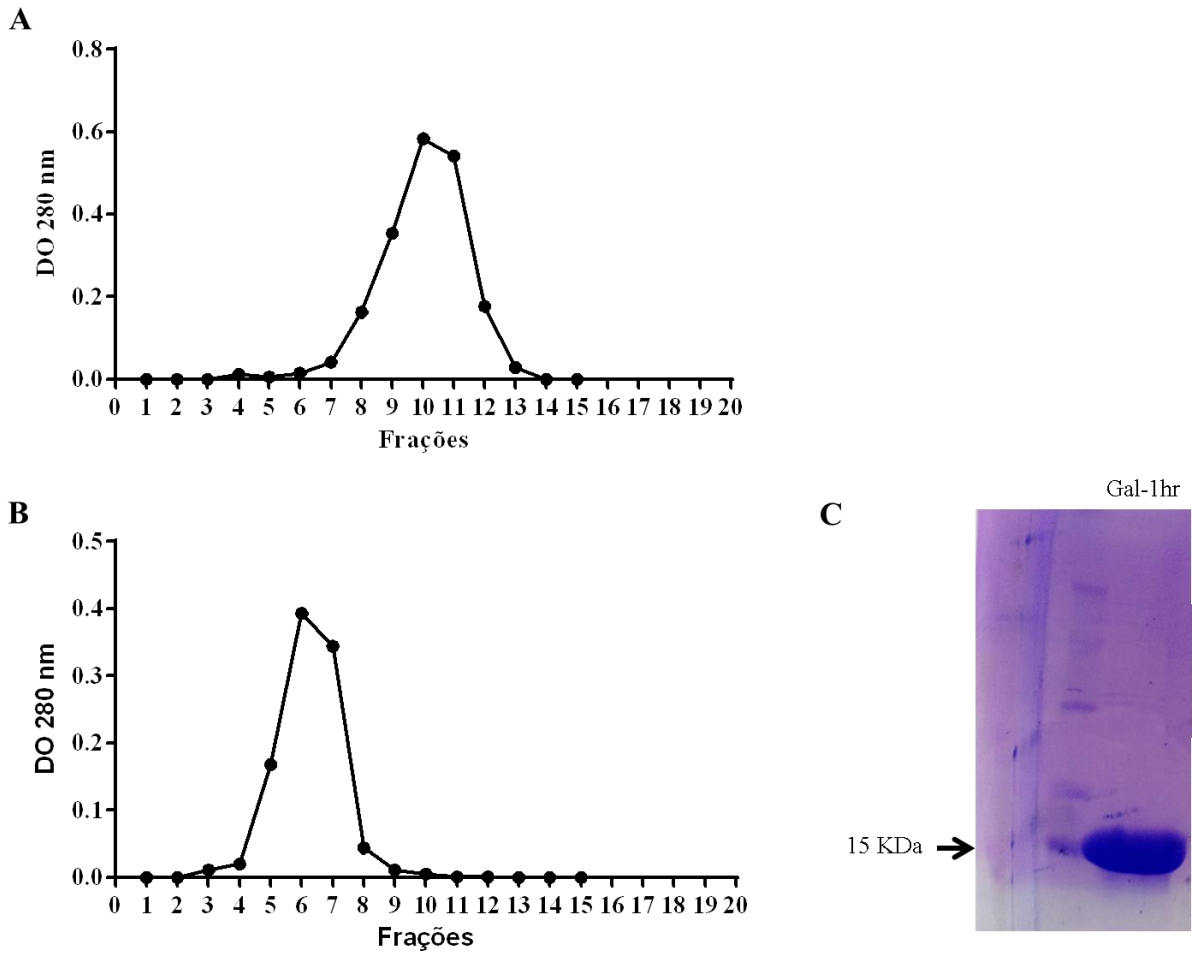

Figura 24. Perfil cromatográfico da purificação de Gal-1 humana recombinante do extrato bruto de bactérias por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A Gal-1hr foi purificada em duas etapas: cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A Gal-1hr purificada teve sua atividade lectínica preservada pelo uso de 100 mM de lactose e 14 mM de 2-ME em suas preparações. As frações cromatográficas foram monitoradas por absorbância em 280 nm. A concentração proteica das frações foram expressas em mg/mL. (A) Perfil cromatográfico em resina agarose-lactose; (B) exclusão por peso molecular em resina PD10; (C) Perfil eletroforético por SDS-PAGE em condições redutoras e dissociantes de Gal-1hr purificada. DO: densidade óptica.

A confirmação da atividade lectínica de Gal-1hr foi verificada por ensaio de hemaglutinação. Observamos a aglutinação das hemácias nos poços contendo de 4,0 a 1,0 μM de Gal-1hr na ausência de lactose ou na presença de sacarose (Figura 25, segunda e terceira linhas). A presença de 20 mM de lactose nos poços com as mesmas concentrações de Gal-1hr inibe a atividade hemaglutinante desta galectina. Isso ocorre devido à lactose se ligar ao CRD de Gal-1hr, impedindo o reconhecimento de glicanas na superfície das hemácias, fazendo com que as hemácias se depositem ao fundo do poço (Figura 25, primeira linha).

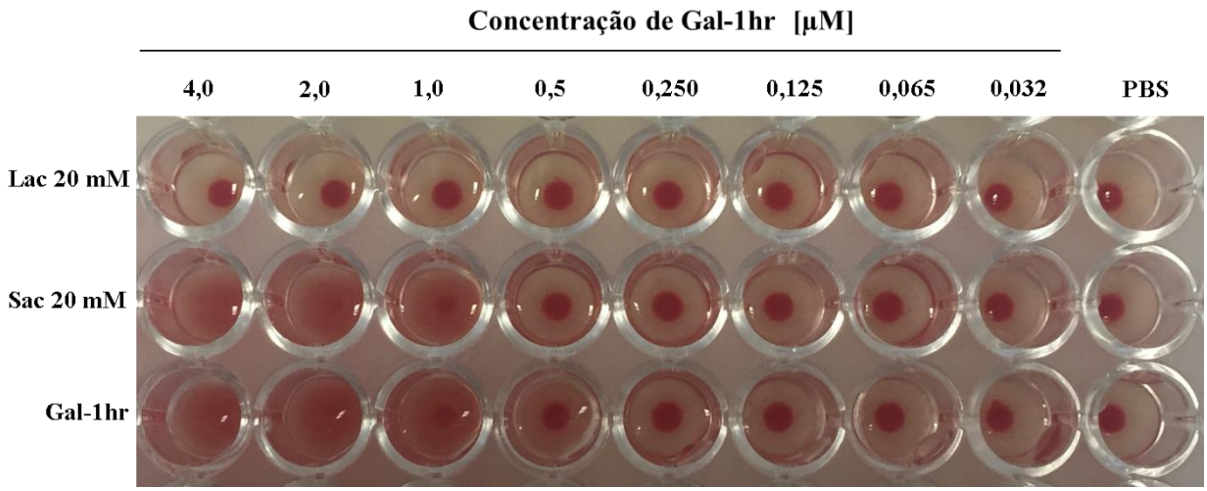

Figura 25. Atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1. Após purificação, remoção de LPS e filtração em 0,22 µm, diferentes concentrações de Gal-1hr foram submetidas a ensaio de hemaglutinação na presença de lactose ou de sacarose. Foi utilizada uma suspensão de hemácias a 3%. Sac 20 mM: sacarose a 20 mM. Lac 20 mM: lactose a 20 mM.

4.8 Gal-1 humana recombinante não se liga à superfície de *Leishmania* sp.

As galectinas podem se ligar à glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos e ativar respostas imunológicas. Já foi demonstrado que Gal-3 e Gal-9 reconhecem LPG de *L. (L.) major*, sendo este reconhecimento benéfico para o parasita e favorecendo a invasão na célula hospedeira e sucesso na infecção (PELLETIER et al., 2003; PELLETIER; SATO, 2002). Dessa forma, nós investigamos se Gal-1 poderia se ligar à superfície de *L. (L.) amazonensis*, e se este seria um mecanismo direto de controle da replicação do parasito no hospedeiro. Para avaliar se ocorre a ligação de Gal-1 à superfície de *Leishmania* sp., Gal-1hr foi derivatizada com FITC (Gal-1hr-FITC), e este procedimento de conjugação não interferiu na atividade lectínica da Gal-1hr (dados não mostrados). Gal-1hr não foi capaz de interagir com *L. (L.) amazonensis*, tanto na presença ou ausência dos carboidratos lactose (carboidrato hapteno específico) ou sacarose (carboidrato hapteno não específico) (Figura 26A). Ainda, testamos se Gal-1hr poderia se ligar a outras espécies de *Leishmania* (Figuras 26A e 26B). Como indicado na Figura 27, a Gal-1hr-FITC não se ligou à superfície nenhuma das outras espécies de *Leishmania* utilizadas neste experimento. Este

resultado sugere que a participação da Gal-1 na evolução da LT experimental não ocorre por meio de uma interação direta com o parasito

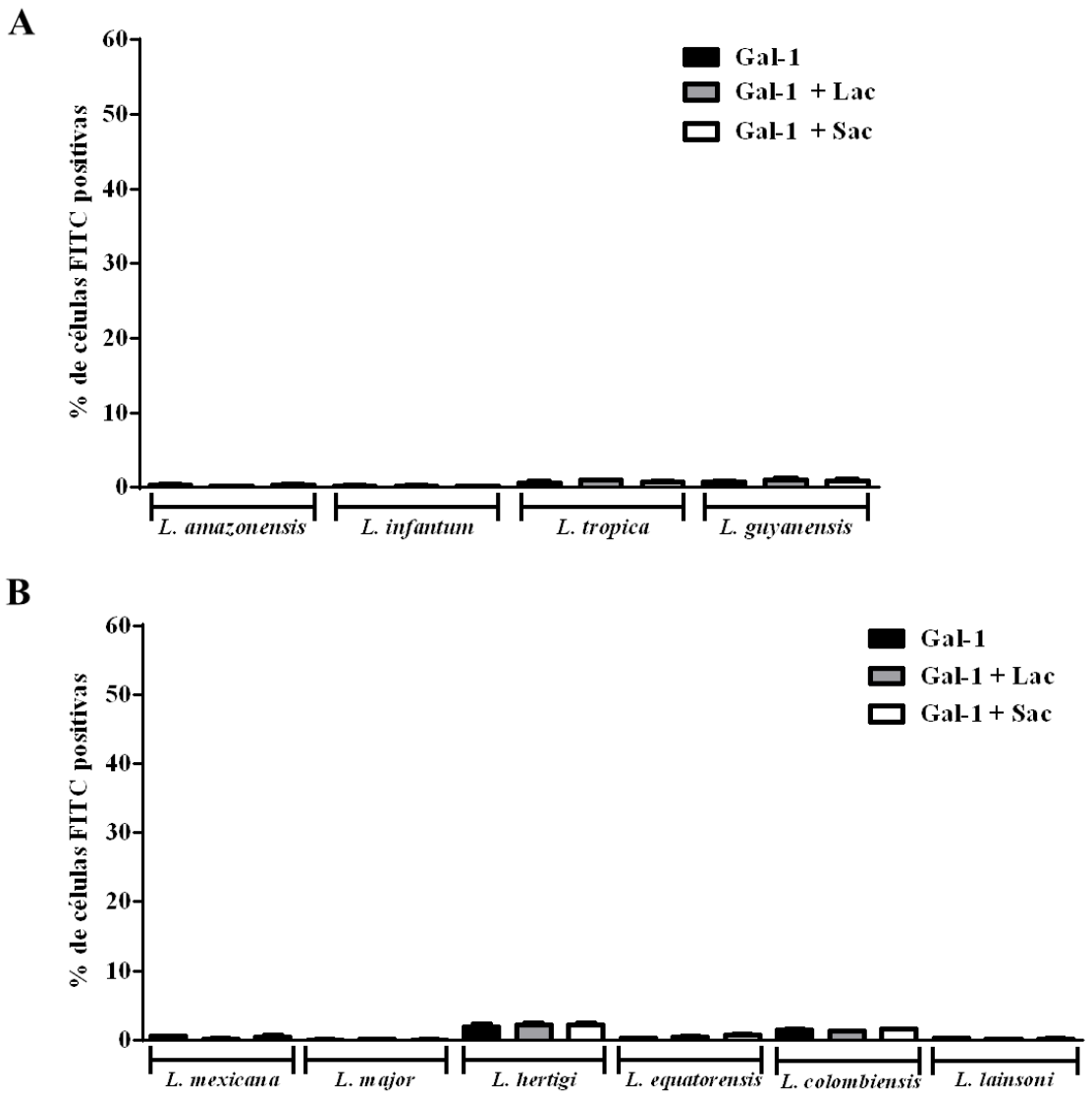

Figura 26. Gal-1 não se liga à superfície de *Leishmania* sp. 5,0 x 10^6 promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, em fase estacionária foram utilizadas neste experimento. Gal-1hr foi previamente derivatizada com FITC (Gal-1hr-FITC). A concentração de Gal-1hr utilizada foi de 1,0 μM. Em seguida, os parasitos foram incubados por 1 hora, em banho de gelo, com Gal-1hr na presença ou ausência de 20 mM de lactose (Gal-1 + Lac) ou sacarose (Gal-1 + Sac). A porcentagem de células FITC positivas foi determinada por citometria de fluxo com o equipamento FACSCanto BD. (A) *L. (L.) amazonensis* cepa PH8, *L. (L.) infantum* cepa PP75, *L. (L.) tropica* cepa STRAIN OD, *L. (V.) gyuanensis* cepa M4147; (B) *L. (L.) mexicana* cepa BEL21, *L. (L.) major* cepa LV39, *L. (L.) hertigi* cepa C8, *L. (V.) equatorensis* cepa LSP1, *L. (V.) colombiensis* cepa 582.34, *L. (V.) lainsoni* cepa M6426. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.9 Gal-4 humana recombinante se liga à superfície de *L. (L.) amazonensis* e não altera a viabilidade do parasito

Nos questionamos se a Gal-4 poderia se ligar a superfície de *L. (L.) amazonensis*. Para isso, Gal-4 foi derivatizada com FITC (Gal-4hr-FITC), e a análise foi feita por citometria de fluxo. A Figura 27 mostra que a Gal-4hr-FITC se ligou à superfície de *L. (L.) amazonensis* de modo concentração-dependente. Na presença de lactose, e não de sacarose, ocorreu uma significativa redução da interação Gal-4hr-FITC e *Leishmania* (Figura 27A). Este achado indica que a capacidade da Gal-4 em reconhecer carboidratos está envolvida em sua interação como *L. (L.) amazonensis*. Diferente da Gal-1 que apresenta um único domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), a Gal-4 é classificada como uma galectina de repetição em série (*tandem-repeat*), portanto apresenta dois CRDs diferentes ligados através de um peptídeo ligador (HADARI et al., 1995). Para avaliar qual dos CRDs é responsável pela ligação a *L. (L.) amazonensis* nós utilizamos os domínios de Gal-4 separados separados e conjugados ao fluoróforo FITC. A Figura 27B mostra que os domínios isolados (CRD1 e CRD2) da Gal-4hr não são capazes de interagir com a superfície de *L. (L.) amazonensis*.

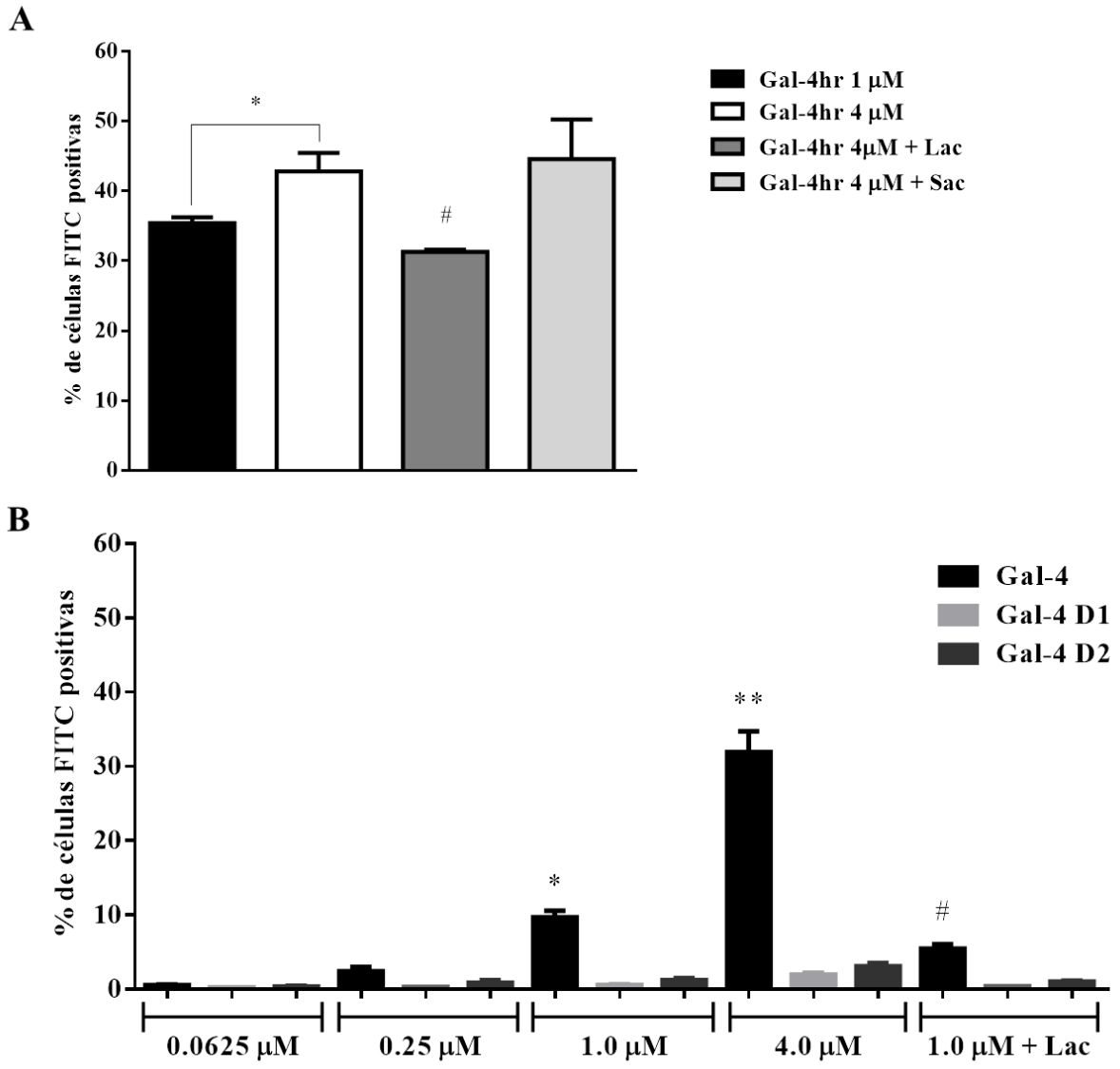

Figura 27. A forma íntegra da Gal-4, diferentemente de seus domínios isolados, interage com a superfície de *L. (L.) amazonensis*. 1,0 x 10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8, em fase estacionária de crescimento foram utilizadas neste experimento. Gal-4hr e seus domínios foram previamente derivatizados com FITC. (A) Gal-4hr foi utilizada nas concentrações de 1,0 μM e 4,0 μM. Em seguida, *L. (L.) amazonensis* foi incubada por 1 hora em banho de gelo com Gal-4hr a 1,0 μM e 4,0 μM, ou Gal-4hr 1,0 μM na presença ou ausência de 20 mM de lactose (Lac) ou de 20 mM de sacarose (Sac). A porcentagem de células FITC positivas foi analisada em citometria de fluxo. (B) Gal-4hr, Gal-4 D1 e Gal-4 D2 foram utilizadas nas concentrações de 0,0625 μM, 0,25 μM, 1,0 μM e 4,0 μM, Gal-4hr, Gal-4 D1, Gal-4 D2 a 1,0 μM na presença de 100 mM de lactose (Lac). Em seguida, *L. (L.) amazonensis* foi incubada por 1 hora em banho de gelo com as diferentes condições de tratamento. A porcentagem de células FITC positivas foi analisada em citometria de fluxo FACSCanto BD. Gal-4 D1: Gal-4 CRD1. Gal-4 D2: Gal-4 CRD2. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. * indica $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; # em relação ao tratamento com Gal-4 a 1,0 ou 4,0 μM, Teste de T.

Gal-4hr liga-se à superfície de bactérias *E. coli* que expressam antígeno mimético ao antígeno B humano e promove a morte destes microorganismos (STOWELL et al., 2010). Diante disto, nos questionamos se a ligação de Gal-4hr à superfície de *L. (L.) amazonensis* poderia provocar a norte do parasito. Para isso, avaliamos a viabilidade de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com Gal-4hr com o uso do ensaios de MTT, como descrito na seção de material e métodos. Utilizamos como controle de vida (CV) promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubadas apenas em meio Schneider's e controle de morte o tratamento com 50 µM de Anfotericina B. As formas promastigotas cultivadas em meio Schneider's apresentaram 100% de viabilidade celular, enquanto que o tratamento com 50 µM de Anfotericina B ocasionou drástica redução da viabilidade celular de formas promastigotas do parasito. Curiosamente, a Gal-4hr não provocou redução da viabilidade celular formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* quando comparado ao parasito tratado com Anfotericina B (Figura 28A).

Com o objetivo de darmos maior robustez aos dados ilustrados pela Figura 28A, investigamos a potencial capacidade da Gal4hr promover a morte de *L. (L.) amazonensis* por meio de outra técnica: a incorporação de iodeto de propídeo (PI) medida por citometria de fluxo. Assim, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com Gal4hr, PBS (controle de vida) ou 10 mM de peróxido de hidrogênio (referência de morte). *L. (L.) amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de Gal-4hr, na presença ou ausência de sacarose, apresentaram porcentagens de viabilidade celular semelhantes ao PBS. Entretanto, o tratamento com 10 mM de peróxido de hidrogênio provocou redução da viabilidade celular de formas promastigotas do parasito (Figura 28B). Diante disso, sugerimos que a interação de Gal-4hr com glicoconjugados da superfície de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não promove a morte do parasito nas concentrações e tempos avaliados neste estudo.

Além disso, avaliamos se a interação de Gal-4hr com gliconjugados de *L. (L.) amazonensis* poderia causar alteração na morfologia do parasito. Neste ensaio formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento foram tratadas com 4,0 µM de Gal-4hr (diluída em PBS) por 1 hora em banho de gelo. Utilizamos como controle de vida promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubadas apenas em PBS por 1 hora em banho de gelo. Após este período os parasitos foram aderidos em lâminas através de centrifugação em centrífuga para citologia de bancada (Cito-Spin). As lâminas foram fixadas, coradas e analisadas em microscópio de campo claro. Observamos que na condição controle, incubação apenas com PBS, as formas promastigotas apresentam-se com morfologia e coloração usuais com a presença de alguns agregados de parasitos (Figura 29A). Estes achados sugerem que a Gal-4hr liga-se na superfície de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e causa a agregação e alteração morfológica destes parasitos, na ausência de morte celular (Figura 29B).

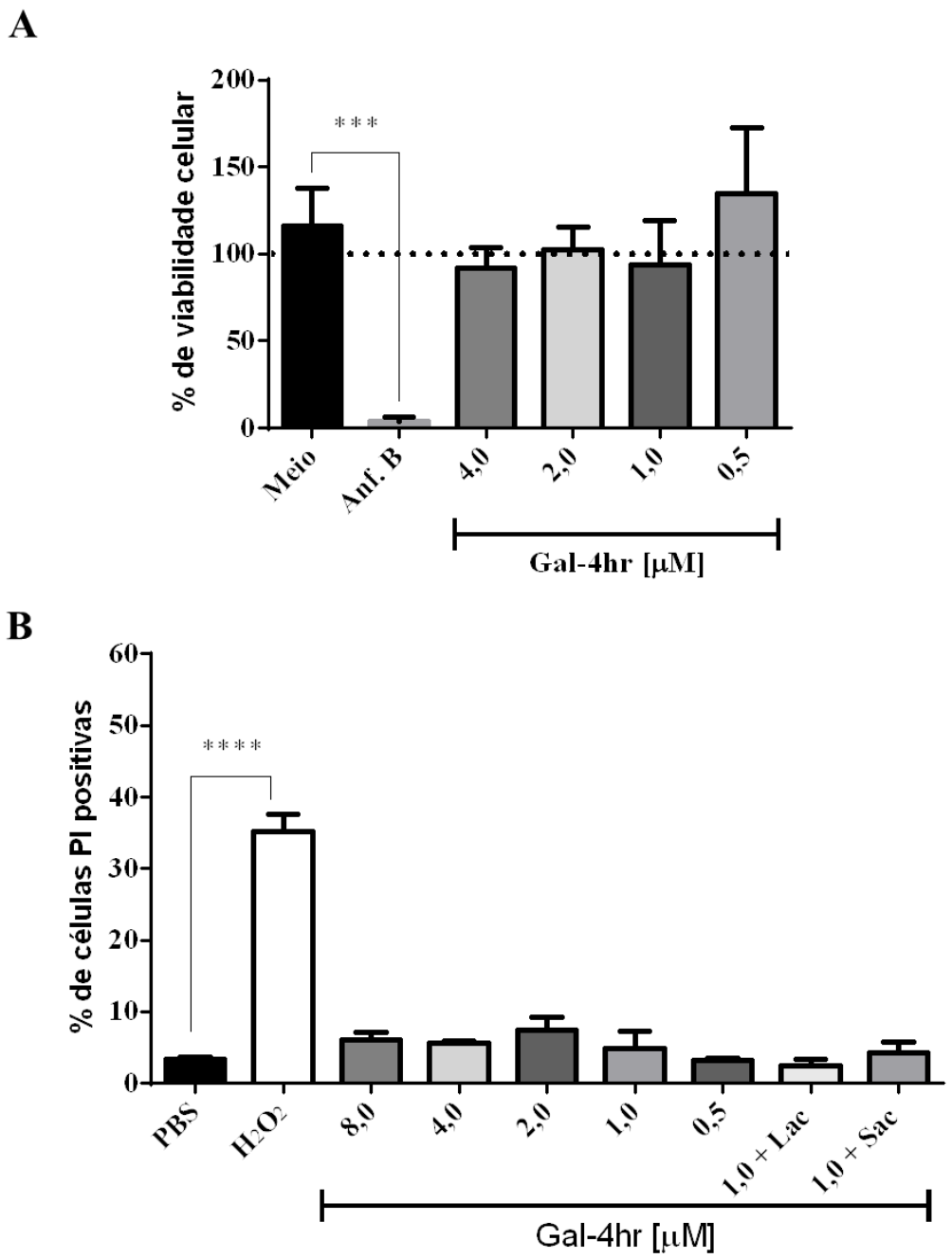

Figura 28. Gal-4 se liga à superfície de *L. (L.) amazonensis* e não altera a viabilidade do parasito. (A) 1,0 x 10^6 formas promastigotas totais de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8, em fase estacionária de crescimento foram tratadas ou não com diferentes concentrações de Gal-4 hr por 24 horas em estufa BOD a 26ºC. Após 24 horas de incubação foi adicionado o MTT e a placa foi incubada por 4 horas em estufa BOD a 26ºC. O sal de formazan produzido foi solubilizado com DMSO. A leitura da absorbância em 570 nm foi realizada em espectrofotômetro. (B) 1,0 x 10^6 formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* foram tratadas ou não com diferentes concentrações de Gal-4 hr por 1 hora em banho de gelo. Controle de morte: *L. (L.) amazonensis* tratada com 10 mM de H_2O_2 por 1 hora a temperatura ambiente. A aquisição e análise dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto BD. CV: controle de vida em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino. Anf. B: anfotericina B a 50 µM. PBS: salina tamponada com fosfato. H_2O_2: peróxido de hidrogênio a 10 mM. Lac: lactose a 40 mM. Sac: sacarose a 40 mM. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. *** indica $P < 0,0005$; ****$P < 0,0001$, Teste de T.

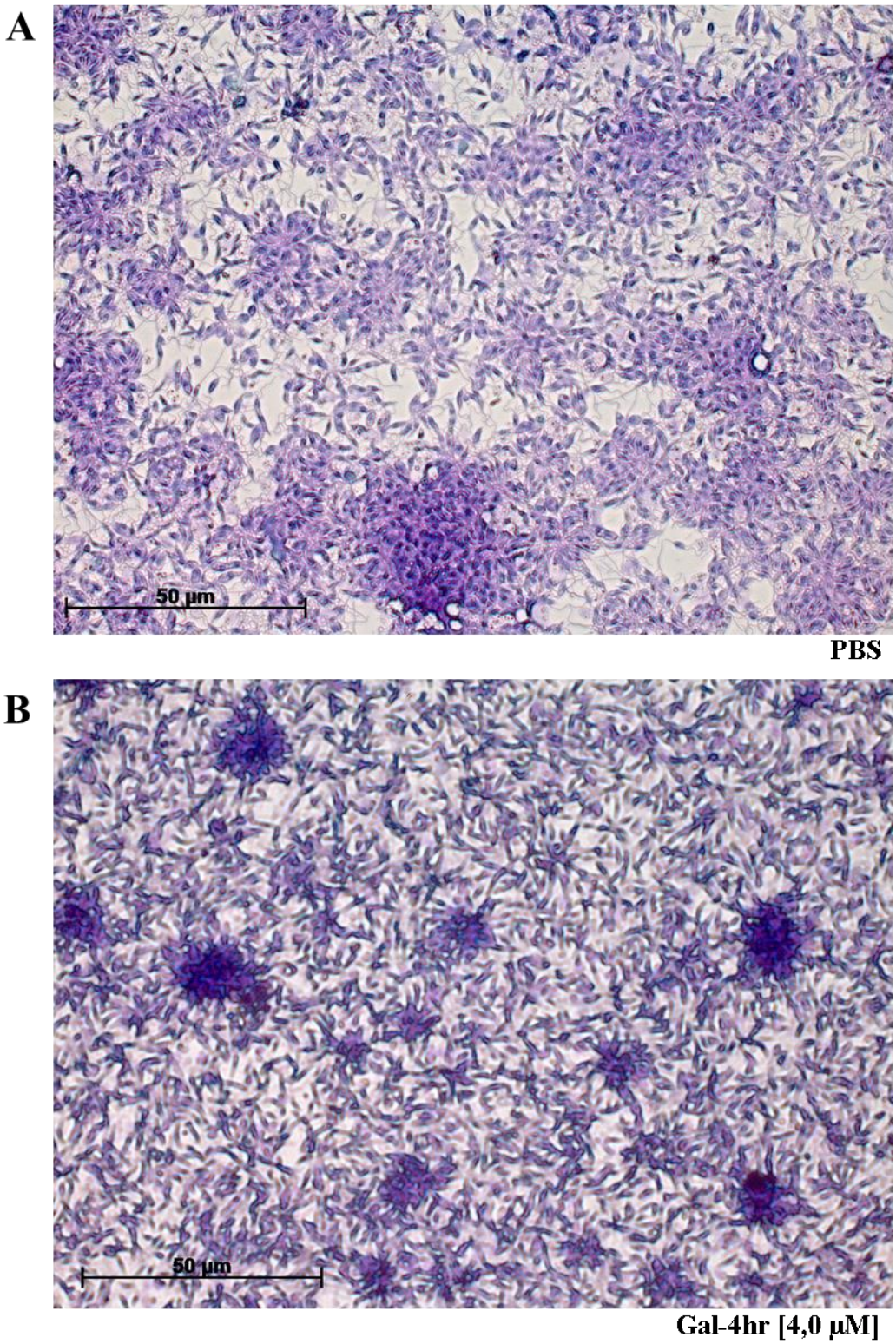

Figura 29. Gal-4 promove aglutinação de *L. (L.) amazonensis* e alteração no aspecto morfológico de formas promastigotas. 1,0 x 10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 foram tratadas ou não com 4,0 µM de Gal-4 hr por 1 hora em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram fixadas em lâminas por centrifugação a 500 rpm por 5 minutos. As lâminas foram coradas por Panótico. *L. (L.) amazonensis* tratada com PBS (A). *L. (L.) amazonensis* tratada com Gal-4hr. (B). Imagens adquiridas em microscópio de campo claro em aumento de 400 vezes.

4.10 Gal-4 humana recombinante reconhece Lipofosfoglicanos purificados de *L. (L.) amazonensis*

O glicoconjugado expresso em maior quantidade na superfície de formas promastigotas de *Leishmania* é o lipofosfoglicano (LPG). Diante disso, nos questionamos se o LPG de *L. (L.) amazonensis* poderia ser um ligante para Gal-4hr. Com o uso de reações de ELISA, foi possível demonstrar que a Gal-4hr é capaz de ligar-se a preparações de LPG purificadas de duas cepas de *L. (L.) amazonensis*, a PH8 (isolada do hospedeiro invertebrado) e a Josefa (isolada de hospedeiro humano) (Figura 30). A Figura 30A demostra que Gal-1hr não foi capaz de interagir com o LPG, assim como também não foi capaz de interagir com a superfície celular de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Figura 26). Considerando que o requerimento químico para a ligação de galectinas é a presença de motivos de β-galctosídeos (ARTHUR et al., 2015), este resultado sugere que a Gal-4hr pode reconhecer resíduos de galactose na estrutura do LPG, como localizados nas regiões conservadas de Gal(β1,4)Man(α1,3), galactose presente nas ramificações laterais e galctose presente no oligossacarídeo terminal (NOGUEIRA et al., 2017). Os dados apresentados até o momento neste trabalho indicam que o LPG pode ser um importante alvo molecular associado à interação entre Gal-4 e *L. (L.) amazonensis*.

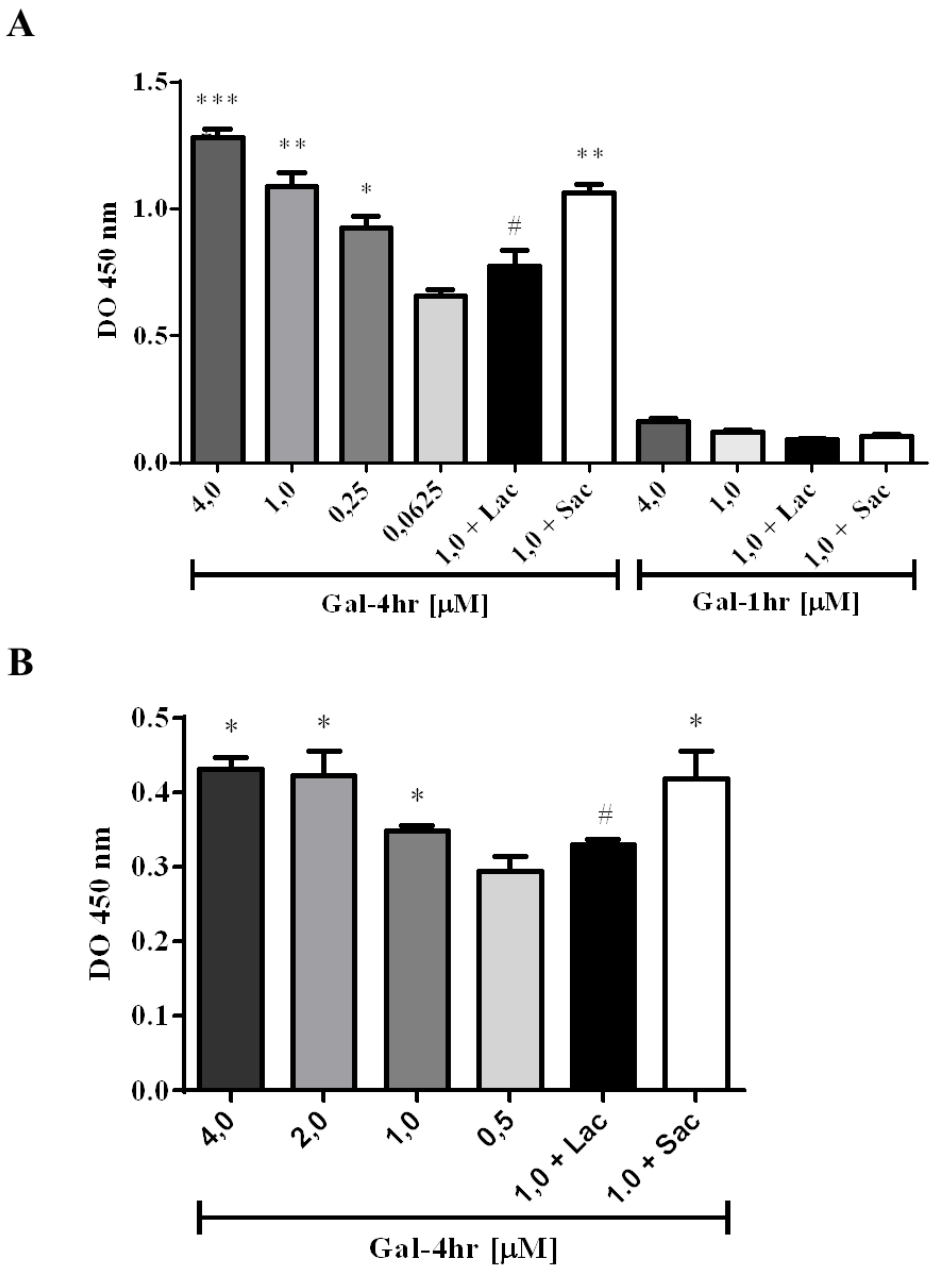

Figura 30. Lipofosfoglicano de *L. (L.) amazonensis* é um alvo molecular de Gal-4. (A) Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5,0 μg de LPG de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8. Em seguida, foram adicionadas Gal-4hr e Gal-1hr, nas concentrações indicadas no gráfico, na presença ou ausência de 20 mM de lactose ou de 20 mM de sacarose. A detecção da ligação de Gal-4hr ou de Gal-1hr ao LPG foi realizada utilizando anticorpo primário anti-Gal-1 e anti-Gal-4 (anticorpo policlonal). A leitura da absorbância em 450 nm foi realizada em espectrofotômetro. Lac: lactose. Sac: sacarose. (B). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5,0 μg de LPG de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa Josefa. Em seguida, foram adicionadas Gal-4hr nas concentrações indicadas no gráfico, na presença ou ausência de 100 mM de lactose ou de 100 mM de sacarose. O bloqueio foi realizado utilizando-se 3% de BSA. A detecção da ligação de Gal-4hr ao LPG foi realizada como descrito em (A). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. * indica $P < 0,05$, *** $P < 0,005$, *** $P < 0,0005$, Teste de T.

4.11 O tratamento de *L.(L.) amazonensis*, mas não o tratamento de macrófagos, com Gal-4 humana recombinante promove o controle da replicação do parasito em macrófagos BALB/c selvagens

O LPG de *Leishmania* participa no processo de metaciclogênese de formas promastigotas e modulação e estabelecimento da infecção em células hospedeiras (SACKS; KAMHAWI, 2001; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Nossos achados até o momento demostraram que o LPG é um alvo molecular de Gal-4 e que esta lectina é recrutada para o sítio da infecção em camundongos. Sendo assim, nos questionamos se a presença de Gal-4hr durante a infecção experimental seria benéfica para o controle da replicação do *L. (L.) amazonensis* por células hospedeiras. Para isso realizamos duas abordagens: (1) pré-tratamento de macrófago com Gal-4hr, seguido de sua infeção parasitária e avaliação de suas capacidades fagocítica e leishmanicida; (2) infecção de macrófagos com *L. (L.) amazonensis* pré-tratada com Gal-4hr, seguida da avaliação de suas capacidades fagocítica e leishmanicida.

Os resultados relacionados à abordagem (1) mostraram não haver diferenças nas capacidades fagocíticas de macrófagos obtidos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ tratados com Gal-4hr, como indicado pelas porcentagens de células infectadas (Figura 31A) e quantidade de amastigotas por células (Figuras 31B, 31C e 31D). Portanto, o tratamento de macrófagos deficientes ou não em Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$) com as concentrações de Gal-4hr e tempos avaliados não afetou a capacidade de fagocitose desses macrófagos.

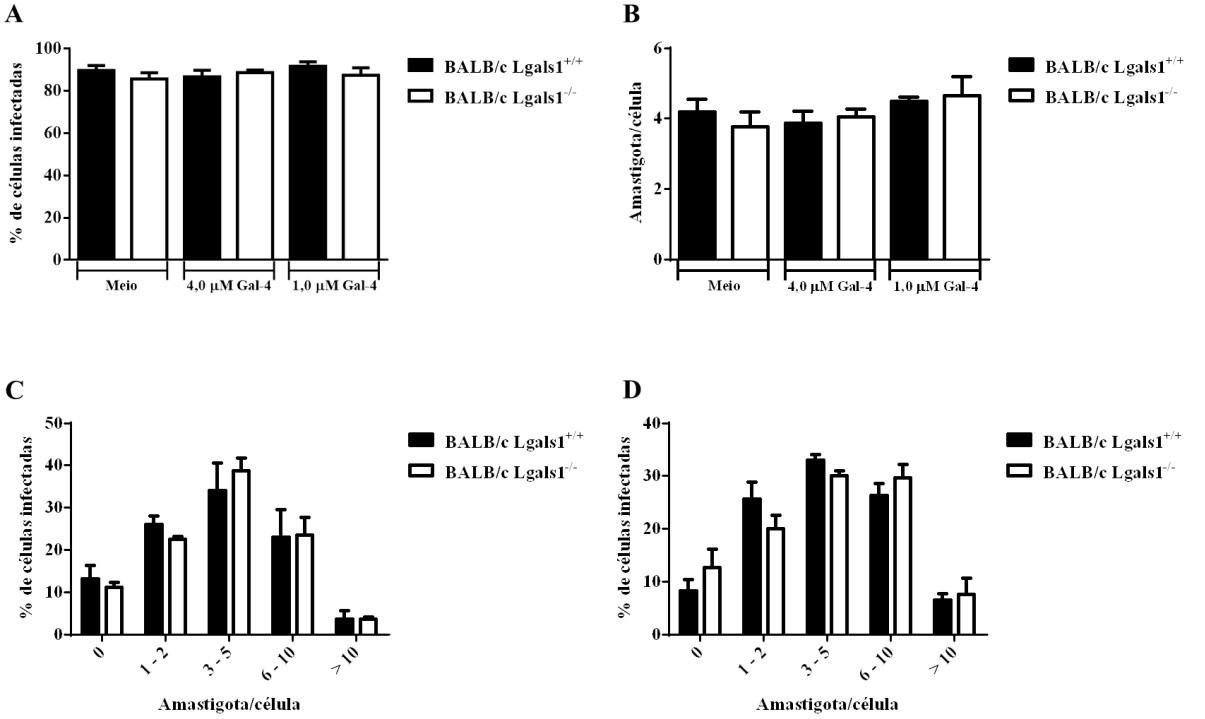

Figura 31. O tratamento de macrófagos com Gal-4 exógena não altera a fagocitose de *L.(L.) amazonensis* em macrófagos BALB/c deficientes ou não em Gal-1. 2,0 x 10^5 macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram tratados, anteriormente à infecção, com 4,0 µM de Gal-4hr ou 1,0 µM de Gal-4hr por 1 hora em estufa a 37ºC a 5% de CO_2. Os macrófagos foram infectados com *L.(L.) amazonensis* cepa PH8, em fase estacionária de crescimento, na proporção de 10 parasitos para 1 célula por 3 horas. Foi realizada a coloração por Panótico e o número de amastigotas por célula foi quantificado por microscopia de campo claro. (A) Foi quantificada a porcentagem de células infectadas, (B) o número de amastigotas por célula, (C) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento dos macrófagos com 4,0 µM de Gal-4hr e (D) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento dos macrófagos com 1,0 µM de Gal-4hr. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Meio: RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Os resultados relacionados à abordagem (2) demonstraram que a infecção de macrófagos obtidos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ com *L. (L.) amazonensis* pré-tratada com Gal-4hr, não alterou a capacidade de fagocitose destes macrófagos, como indicado pelas semelhanças nas porcentagens infecção celular (Figura 32A) e quantidade de amastigota por células (Figuras 32B, 32C e 32D). Portanto, o tratamento de *L. (L.) amazonensis* com as concentrações de Gal-4hr e tempos avaliados não afetou a capacidade de fagocitose de macrófagos deficientes ou não em Gal-1 (BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$).

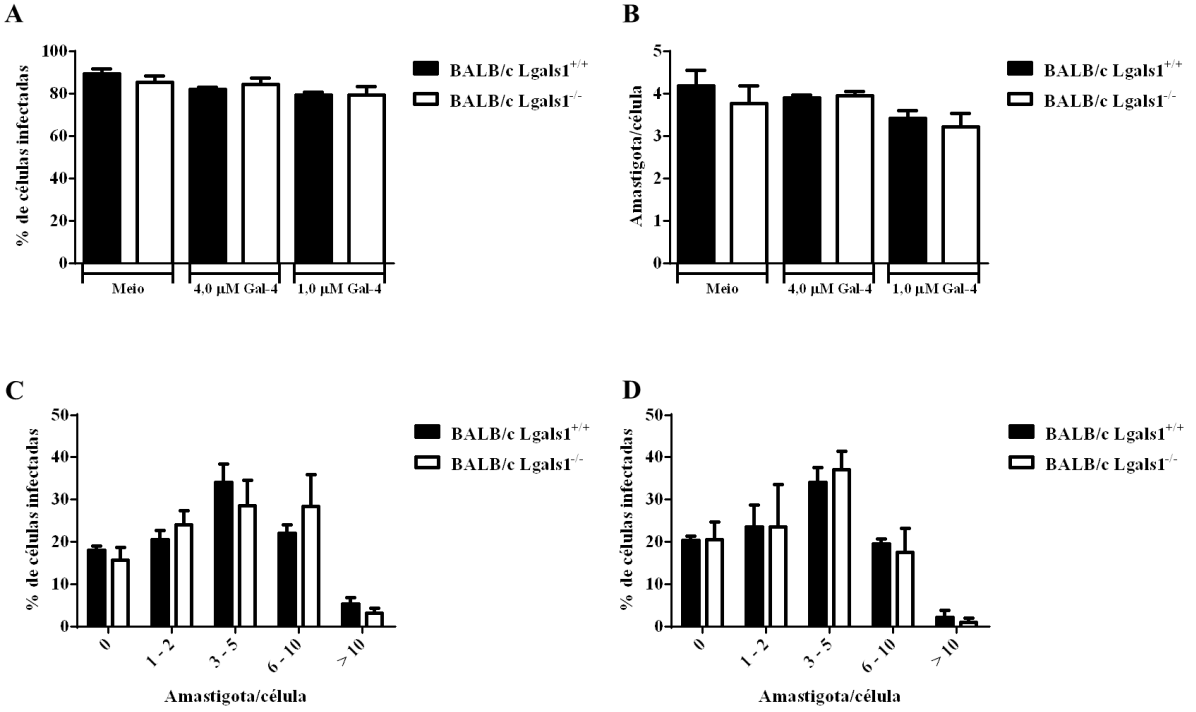

Figura 32. O tratamento de *L.(L.) amazonensis* com Gal-4 exógena não altera a fagocitose deste parasito em macrófagos BALB/c deficientes ou não em Gal-1. Anteriormente à infecção, promastigotas de *L.(L.) amazonensis* cepa PH8 em fase estacionária de crescimento, foram tratadas com 4,0 µM de Gal-4hr ou 1,0 µM de Gal-4hr por 1 hora em banho de gelo. Os macrófagos 2,0 x 10^5 macrófagos, obtidos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$, foram infectados com *L.(L.) amazonensis*, tratada com Gal-4hr, na proporção de 10 parasitos para 1 célula por 3 horas. Foi realizada a coloração por Panótico e o número de amastigotas por célula foi quantificado por microscopia de campo claro. (A) Foi quantificada a porcentagem de células infectadas, (B) o número de amastigotas por célula, (C) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento de *Leishmania* com 4,0 µM de Gal-4hr e (D) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento de *Leishmania* com 1,0 µM de Gal-4hr. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Meio: RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Em seguida, avaliamos se o pré-tratamento de macrófagos ou de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4hr poderia alterar a atividade leishmanicida destes fagócitos. A Figura 33 ilustra a semelhança nas atividades leishmanicidas de macrófagos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ tratados com 4,0 ou 1,0 µM de Gal-4hr, como indicado pela similaridade numérica das porcentagens de macrófagos infectados (Figura 35A) e das quantidades de amastigota por fagócito (Figuras 33B, 33C e 33D). Curiosamente, os macrófagos derivados de animais BALB/c Lgals1$^{-/-}$, independente do tratamento com Gal-4hr, controlam de forma mais eficiente à infecção experimental quando comparados com macrófagos de animais selvagens (BALB/c Lgals1$^{+/+}$). Este dado reforça os achados *in vivo* sobre a menor suscetibilidade de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ em comparação com os camundongos selvagens da mesma linhagem (Figura 14). Portanto, o tratamento de

macrófagos (BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$) com as concentrações de Gal-4hr e tempos avaliados não afetou a capacidade de restrição da multiplicação de *L. (L.) amazonensis* nesses macrófagos.

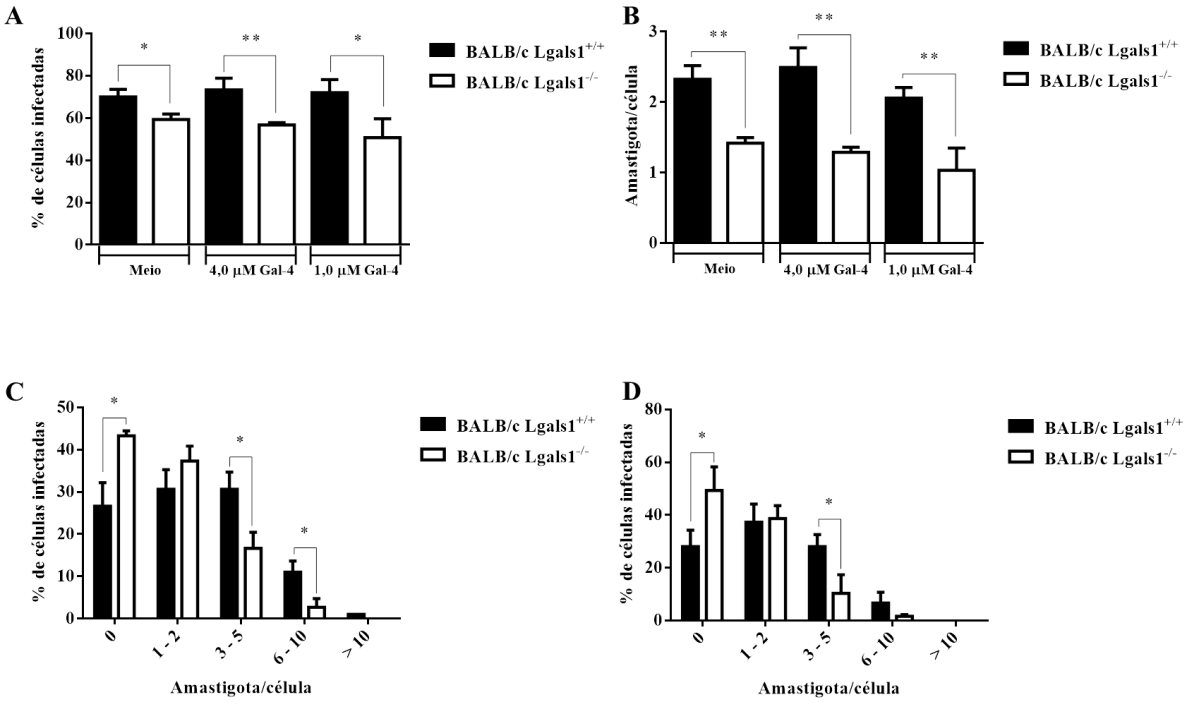

Figura 33. O tratamento de macrófagos com Gal-4 exógena não altera a multiplicação de *L.(L.) amazonensis* em macrófagos BALB/c deficientes ou não em Gal-1. 2,0 x 10^5 macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$ foram tratados, anteriormente à infecção, com 4,0 µM de Gal-4hr ou 1,0 µM de Gal-4hr por 1 hora em estufa a 37ºC a 5% de CO_2. Os macrófagos foram infectados com *L.(L.) amazonensis* cepa PH8, em fase estacionária de crescimento, na proporção de 10 parasitos para 1 célula por 3 horas. Os poços foram lavados, adicionado meio RPMI e as células foram incubadas por 24 horas. Foi realizada a coloração por Panótico e o número de amastigotas por célula foi quantificado por microscopia de campo claro. (A) Foi quantificada a porcentagem de células infectadas, (B) o número de amastigotas por célula, (C) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento dos macrófagos com 4,0 µM de Gal-4hr e (D) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento dos macrófagos com 1,0 µM de Gal-4hr. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Meio: RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. * indica $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ Teste de T (A e B) e análise de variância (ANOVA) seguida por pós teste de Bonferroni (C e D).

Também avaliamos se o tratamento de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4hr poderia alterar a atividade leishmanicida dos macrófagos deficientes ou não de Gal-1. Observamos que macrófagos de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ quando infectados com *L. (L.) amazonensis* pré-tratadas com Gal-4hr, controlam a infecção de forma similar ao observado em macrófagos de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$, pré-tratados ou não com Gal-4hr (Figura

34). Este controle da infecção foi observado pela redução da porcentagem de células infectadas (Figura 34A) e redução da quantidade de amastigota por células (Figuras 34B, 34C e 34D). Portanto, sugerimos que o tratamento de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4hr exógena favorece o controle da replicação do parasito, apenas, em macrófagos obtidos de camundongos selvagens (BALB/c Lgals1$^{+/+}$).

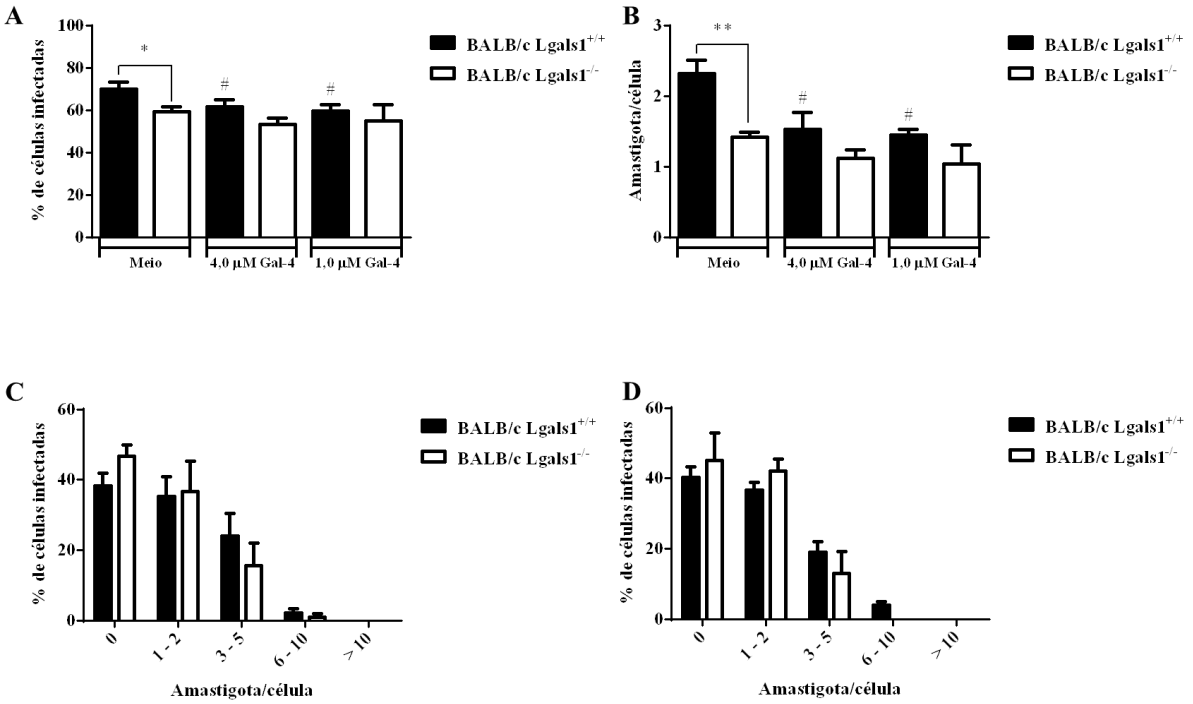

Figura 34. O tratamento de *L.(L.) amazonensis* com Gal-4 exógena favorece o controle da replicação do parasito em macrófagos BALB/c Lgas1$^{+/+}$. Anteriormente à infecção, promastigotas de *L.(L.) amazonensis* cepa PH8 em fase estacionária de crescimento, foram tratadas com 4,0 µM de Gal-4hr ou 1,0 µM de Gal-4hr por 1 hora em banho de gelo. Os macrófagos 2,0 x 10^5 macrófagos, obtidos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ e BALB/c Lgals1$^{-/-}$, foram infectados com *L.(L.) amazonensis*, tratada com Gal-4hr, na proporção de 10 parasitos para 1 célula por 3 horas. Os poços foram lavados, adicionado meio RPMI e as células foram incubadas por 24 horas. Foi realizada a coloração por Panótico e o número de amastigotas por célula foi quantificado por microscopia de campo claro. (A) Foi quantificada a porcentagem de células infectadas, (B) o número de amastigotas por célula, (C) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento de *Leishmania* com 4,0 µM de Gal-4hr e (D) a contagem diferencial do número de amastigotas por célula na condição de tratamento de *Leishmania* com 1,0 µM de Gal-4hr. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Meio: RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. * indica $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ Teste de T (A e B) e análise de variância (ANOVA) seguida por pós-teste de Bonferroni (C e D). # em relação à condição macrófagos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ tratados apenas com meio RPMI.

4.12 A injeção intraperitoneal de Gal-4hr em camundongos BALB/c Lgas1$^{+/+}$ causa o seu acúmulo no sítio da infecção por *L. (L.) amazonensis*

Com base em alguns resultados deste trabalho e dados da literatura: *i*) Gal4-hr liga-se a superfíe de *L. (L.) amazonensis* (Figuras 28 e 31), possivelmente, via o reconhecimento de LPG; *ii*) a interação Gal-4hr e *L. (L.) amazonensis* favorece o controle de replicação parasitária em macrófagos obtidos de camundongos BALB/c Lgas1$^{+/+}$ (Figura 3); *iii*) Gal-4 apresenta funções de modulação da resposta imunológica e ligação a patógenos (ARASU et al., 2017; CHEN et al., 2019a; HOKAMA et al., 2004; STOWELL et al., 2010), testamos se Gal-4 poderia estar presente no sítio da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Para isso, utilizamos o modelo de infecção experimental de suscetibilidade, camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ foram infectados na orelha esquerda por via intradérmica com 1,0 x 10^6 formas promastigotas totais de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento. Utilizamos camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ não infectados como controle negativo. Visando avaliar se Gal-4hr seria recrutada para o sítio da infecção ou linfonodo drenante, esta lectina foi marcada com tecnécio radioativo, sendo denominada Gal-4^{99m}Tc. Primeiro, avaliamos a eficiência da radiomarcação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid cromatography*). Estes resultados são apresentados na Figura 35, cromatograma do radioativo HYNIC-^{99m}Tc detectado com detector de radiação Gabi (Figura 35A), cromatograma de aborbância registrado em 220 nm (Figura 35B) e 280 nm (Figura 27C) de Gal-4-HYNIC-^{99m}Tc. Demonstramos que a Gal-4hr foi eficientemente radiomarcada com ^{99m}Tc com tempo de retenção de cerca de 9,4 minutos. Não foram detectadas impurezas radioativas e não radioativas. Os resultados da detecção de Gal-4^{99m}Tc (Gal-4-HYNIC-^{99m}Tc) *in vivo* são apresentados em formato de imagens e gráfico representativo (Figura 36), em que são observadas imagens de tomografia computadorizada (CT), imagens de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), e a sobreposição das imagens de tomografia computadorizada e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT/CT). Em camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ na ausência de infecção demonstramos que a Gal-4^{99m}Tc apresenta-se predominantemente nos rins dos camundongos (Figura 36A, imagem composta por SPECT/CT), isso demostra que Gal-4^{99m}Tc tem alta taxa de depuração renal assim como já demonstrada por outras moléculas radiomarcadas (SARCINELLI et al., 2016). Curiosamente, detecmos o recrutamento de Gal-4hr para a orelha esquerda, sítio da infecção, de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ após oito

semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis* (Figura 36B, imagem composta por SPECT/CT). O gráfico representativo da detecção de Gal-4^{99m}Tc nas orelhas direita e esquerda de camundongos não infectados e camundongos infectados confirma os nossos achados, é possível notar que Gal-4 exógena (Gal-4^{99m}Tc) está presente em grande quantidade no sítio da infecção de camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$ quando comparado com a orelha contralateral que não foi infectada e com as orelhas dos camundongos não infectados (Figura 36C).

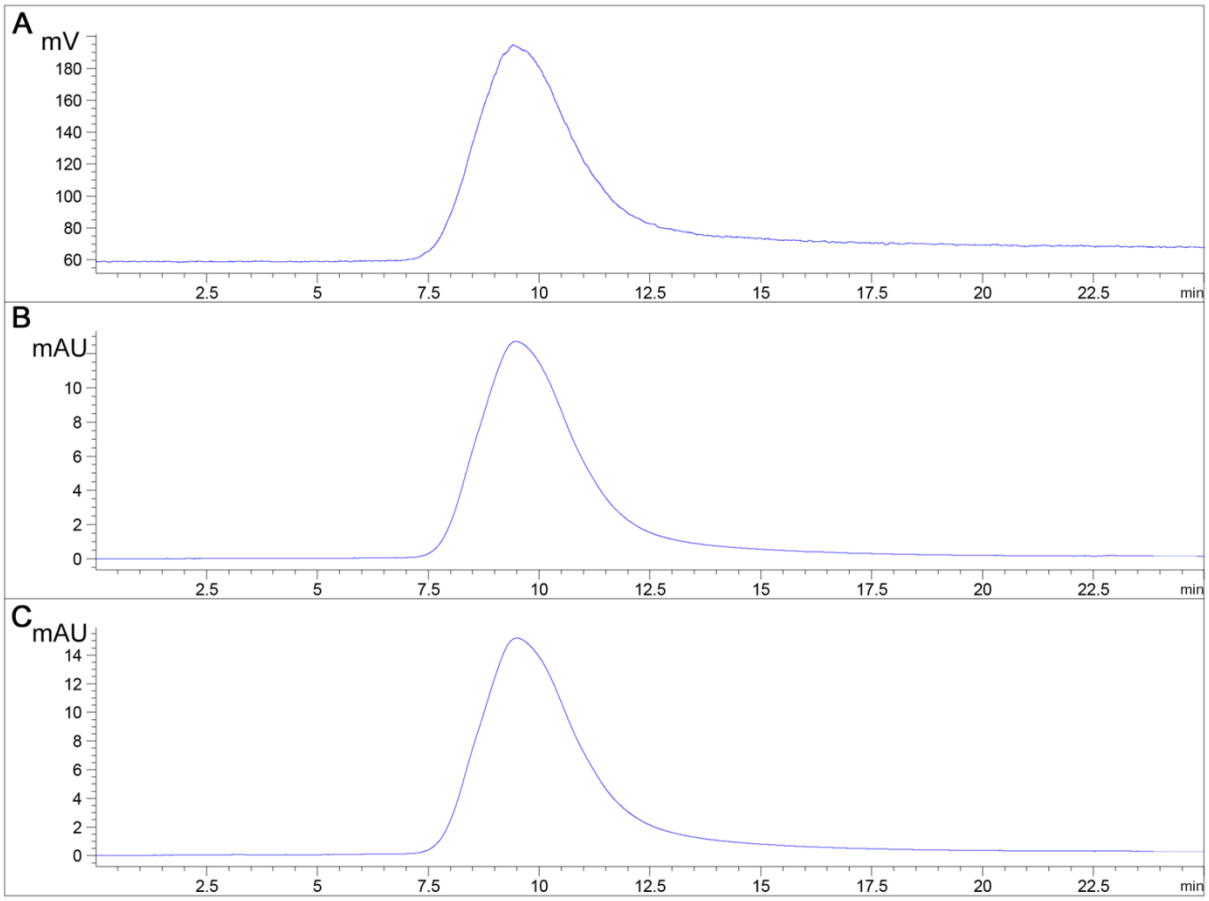

Figura 35. Controle de qualidade de Gal-4-HYNIC-^{99m}Tc por HPLC analítico. (A) Cromatograma da radioatividade HYNIC-^{99m}Tc detectado com detector de radiação Gabi (Raytest-Alemanha) e (B, C) cromatograma de aborbância registrado em 220 nm (B) e 280 nm (C) de Gal-4-HYNIC-^{99m}Tc. Coluna: Protein-Pak 125 I-125A 10 µM 7,8 x 300 mm (Waters-USA), fluxo 1,0 mL/min. Fase móvel: 50 mM de tampão fosfato, pH=7,0. mV: miliVolts. mAU: unidade de absorbância. Eixo X: tempo em minutos.

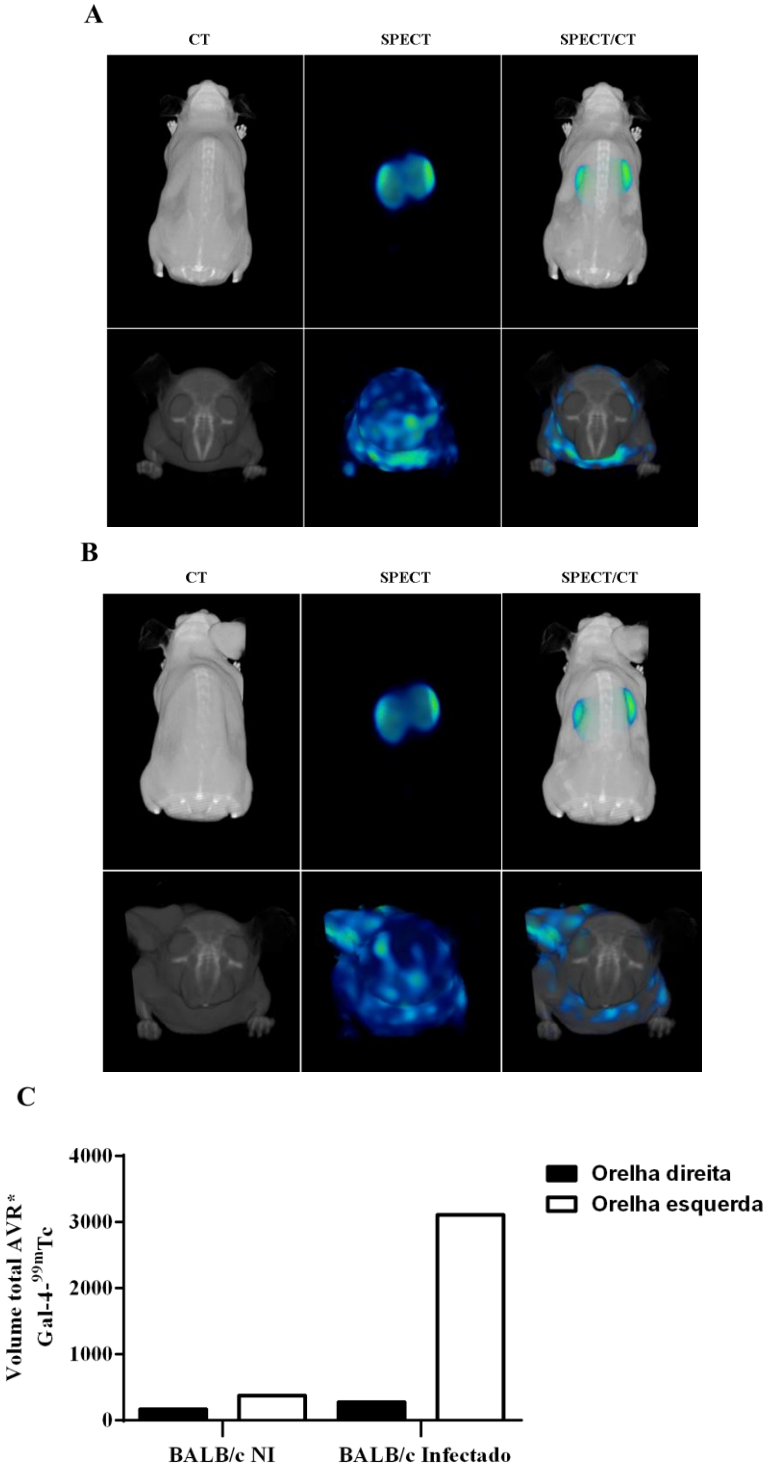

Figura 36. Gal-4 exógena é recrutada para o sítio da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Camundongos fêmeas BALB/c Lgals1$^{+/+}$ foram infectados, intradermicamente, com 1,0 x 10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8 na orelha esquerda. Detecção de Gal-4-^{99m}Tc após 8 semanas de infecção. (A) Imagem representativa de camundongo BALB/c Lgals1$^{+/+}$ não infectado, BALB/c NI, (B) camundongo BALB/c Lgals1$^{+/+}$ infectado, BALB/c infectado, (C) gráfico representativo da detecção de Gal-4-^{99m}Tc. CT: imagem de tomografia computadorizada; SPECT: imagem de tomografia computadorizada por emissão de fóton único; SPECT/CT: combinação das imagens de tomografia computadorizada e emissão de fóton único.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Por meio deste trabalho demonstramos que a Gal-1 e a Gal-4 participam da evolução da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*, por diferentes vias. O envolvimento da Gal-1 não depende de sua interação direta com moléculas da superfície do parasito, enquanto que a participação da Gal-4 parece depender de sua ligação com um importante glicoconjugado da superfície deste parasito, o LPG. A interação Gal-4-parasito favorece a atividade leishmanicida de macrófagos obtidos de camundongos selvagens da linhagem BALB/c, enquanto a ausência do gene da Gal-1 nesta linhagem de camundongos promove um padrão de resposta imunológica que desfavorece a progressão desta infeccção experimental.

O estudo do papel da Gal-1 na leishamaniose tegumentar experimental iniciou-se pela obtenção de camundongos BALB/c, linhagem susceptível à infecção por *Leishmania* (GOVENDER et al., 2018; HANDMAN; CEREDIG; MITCHELL, 1979; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002), deficientes do gene da Gal-1, uma importante molécula imunoreguladora (BLOIS et al., 2007; ILARREGUI et al., 2009; PONCINI et al., 2015; TOSCANO et al., 2007). Como demonstrado no presente trabalho, foi possível obter camundongos BALB/c Lgas1$^{-/-}$ viáveis, férteis e sem qualquer fenótipo aparente, como descrito para outra linhagem murina deficiente de Gal-1 (POIRIER; ROBERTSON, 1993).

Em seguida, foi feita uma análise comparativa do padrão de evolução desta infecção entre camundongos da linhagem C57BL/6, resistentes à leishmaniose, e BALB/c deficientes ou não de Gal-1 Nós demonstramos que camundongos deficientes em Gal-1 de fundo genético C57BL/6 não apresentaram diferença na curva de desenvolvimento da lesão na infecção por *L. (L.) amazonensis* quando comparados com camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$. Ambos os camundongos desenvolveram lesão crônica após a infecção com *L. (L.) amazonensis*. Após a realização da quantificação da carga parasitária observamos menor carga parasitária nos camundongos deficientes em Gal-1, enquanto que, no linfonodo drenante, nós observamos uma tendência à redução no número de parasitos. Entretanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. Além disso, macrófagos derivados de precursores da medula óssea e macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ e C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ apresentaram atividade fagocítica e leishmanicida similares. Poncini e colaboradores demostraram que camundongos da linhagem C57BL/6 e

deficientes em Gal-1 controlaram melhor a infecção por *T. cruzi* quando comparados com camundongos C57BL/6 selvagens. (PONCINI et al., 2015).

Neste cenário, avaliamos se a deficiência de Gal-1 em camundongos de fundo genético BALB/c apresentaria impacto na evolução da LT experimental causada por *L. (L.) amazonensis*. Curiosamente, camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ desenvolveram menor edema na orelha quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$. Os camundongos infectados e deficientes em Gal-1 apresentaram menor carga parasitária no linfonodo drenante quando comparados com camundongos BALB/c selvagens. Este resultado indica o papel da modulação de Gal-1 em respostas imunológicas e a justifica o investimento no desenvolvimento de camundongos da linhagem BALB/c deficientes do gene da Gal-1 para o estudo experimental de doenças. A linhagem de camundongos usada em modelos experimentais pode interferir nos padrões fenotípicos apresentados (MATHIEU et al., 2008), assim como reportado no presente trabalho.

Nossos dados indicam que o desfavorecimento da reposta protetora exercida Gal-1 ocorre de modo indireto, uma vez que não possível detectar a interação direta desta galectina com *L. (L.) amazonensis*. A menor suscetibilidade de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ frente a esta infecção parasitária poder ser caracterizada pelo aumento de IFN-γ e diminuição de outras citocinas no sítio da infecção (IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF-α) e aumento da produção de IL-10 no linfonodo drenante. Este perfil de citocinas pode ser correlacionado com dados da literatura, nos quais são demonstrados que camundongos e humanos infectados por *L. (L.) amazonensis* apresentam baixa ativação celular e uma resposta imunológica mista com ausência do paradigma Th1/Th2. (SILVEIRA et al., 2009; SOONG et al., 1997; VANLOUBBEECK et al., 2004). Nossos resultados, em conjunto com os dados da literatura, sugerem que a ausência de Gal-1 atuaria aumentando a ativação de células T produtoras de IFN-γ com consequente ativação de mecanismos leishmanicidas, diminuindo a produção de IL-4 e IL-10 e modulando a produção de TNF-α, com consequente menor dano tecidual nas orelhas de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$. Dessa forma, a resposta imunológica de perfil misto de citocinas de linfótios T reportada no presente trabalho está em acordo com descrições da literutua quanto ao mecanismo de resistência contra *Leishmania* sp., uma vez que células T produzem grande quantidade de IFN-γ que ativam os macrófagos infectados a eliminarem o parasito por meio da produção de NO (HEINZEL et al., 1993; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SYPEK et al., 1993). Por outro lado, nossos resultados mostram que a ausência de Gal-1 endógena em camundongos da linhagem C57BL/6 não causa

alteração no padrão de resolução da infecção por *L.(L.) amazonensis*. Ao contrário, Bunn e colaboradores demonstraram que camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ são mais resistentes à infecção por *L. (L.) donovani* em comparação com os camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ de Gal-1 (BUNN et al., 2017). Curiosamente, segundo estes autores, a maior de resistência dos camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ não depende da produção de IL-10 por células Treguladoras e isto está em aparente desacordo com a literatura que descreve a Gal-1 com um potente indutor e de T reguladoras (GARÍN et al., 2007). Este fenótipo de resistência também foi descrito em nosso trabalho, apesar das diferenças experimentais, como espécie de *Leishmania* e linhagem de camundongo. Entretanto, a IL-10 parecer participar do fenótipo de resistência à leishmaniose em camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ (Figuras 19 e 20). Os achados deste grupo sobre o favorecimento da reposta protetora com Leishmania em camundongos deficientes em Gal-1 são semelhantes aos nossos resultados mostrando resultados em também em desacordo com os já apresentados em estudos *in vitro* utilizando células tumorais (CEDENO-LAURENT et al., 2012) e estudos *in vivo* na infecção experimental por *T. cruzi* (PONCINI et al., 2015). Além disso, já foi demonstrado que na infecção por *Yersinia enterocolítica*, uma bactéria intracelular, Gal-1 ativa um programa tolerogênico que agrava à infecção por reprimir as respostas imunológicas contra a bactéria. Nesse contexto a Gal-1 modularia a produção de IFN-γ, IL-6, TNF-α, IL-17 e síntese de NO (DAVICINO et al., 2017).

Nós demonstramos menor suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c deficientes em Gal-1 que foi acompanhada por uma hiperplasia reacional nos linfondos drenantes com manutenção da arquitetura dos centros germinativos linfoides. Enquanto que, nos camundongos BALB/c selvagens também detectamos essa hiperplasia nos linfonodos, entretanto houve desestruturação da arquitetura dos centros germinativos linfoides com presença de outras células inflamatórias, principalmente de macrófagos. Este dado sugere que na presença de Gal-1, uma molécula endógena indutora de uma perfil Th2 (RABINOVICH; ILARREGUI, 2009; TOSCANO et al., 2007), o camundongo é incapaz de promover uma resposta protetora eficiente contra a leishmaniose. Além disso, em camundongos BALB/c selvagens detectamos no sítio da infecção uma diminuição de IFN-γ, aumento das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF-α), enquanto que no linfonodo retromaxilar ocorreu uma detecção de IL-10. Nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que já foi demonstrado que Gal-1 controla a suscetibilidade na infecção experimental *in vivo* por *T. cruzi*, sendo na análise histológica de tecido do miocárdio de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ apresentou maior número de ninhos de amastigotas quando

comparado com camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ (PONCINI et al., 2015). Além disso, trabalhos recentes também corroboram nossos resultados, camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ apresentaram melhora no controle da replicação de *L. (L.) donovani* no fígado, entretanto no baço a carga parasitária foi a mesma na presença ou na ausência de Gal-1, o que demonstra um amplo potencial imunorregulador de Gal-1 e cuja extensão parece depender do tecido infectado (BUNN et al., 2017).

Nossos resultados mostram que a deficiência de Gal-1 em ambas as linhagens de camundongos parece favorecer a eliminação do parasito com maior eficiência quando comparados com camundongos selvagens. Em camundongos da linhagem BALB/c Lgals1$^{-/-}$ o controle da carga parasitária é mais evidente, sugerindo a participação de macrófagos no controle da replicação de *L. (L.) amazonensis* e o estabelecimento de uma resposta protetora no linfonodo drenante, sugerindo um potencial regulador de Gal-1 de acordo com o tecido infectado. Estes dados estão de acordo com os já apresentados em outros trabalhos, em que foi apresentado um papel de Gal-1 no direcionamento da ativação de macrófagos para a via alternativa (ANDERSEN et al., 2017; CORREA et al., 2003).

Considerando que as galectinas podem participar de processos infecciosos por meio de uma ação microbicida direta (STOWELL et al., 2010), investigamos a possibilidade da Gal-1 (forma dimérica) e da Gal-4 (forma completa e seus CRDs isolados) de interagir com a superfície celular de *L. (L.) amazonensis* e o impacto desta potencial interação sobre a viabilidade celular do parasito. Curiosamente, apenas a Gal-4 completa foi capaz de interagir com o parasito de modo sensível a lactose e sem provocar a morte deste patógeno. Isso nos sugere que a geometria da molécula seja fundamental para que a ligação ocorra. Além disso, este dado também nos sugere que o peptídeo ligador apresente função no reconhecimento de ligantes como já demonstrado em outros trabalhos. O peptídeo ligador é fundamental para a organização estrutural de Gal-4 e comunicação entre os seus domínios (ANDRÉ et al., 2014; RUSTIGUEL et al., 2016).

Ainda, a ligação da Gal-4 em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* provocou aglutinação, alterações morfológicas e padrão de coloração mais ácido após coloração por panótico, sem comprometer sua viabilidade e sua capacidade de infectar macrófagos. Estes resultados sugerem que a Gal-4 pode provocar alterações bioquímicas/metabólicas importantes na relação parasito-hospedeiro. Entretanto, a execução de estudos mais aprofundados poderá apresentar uma melhor dimensão do papel da Gal-4 na relação *Leishmania*-hospedeiro. Em contrapartida, Gal-1 apresentou baixa afinidade tanto

para *L. (L.) amazonensis* quanto para as outras espécies de *Leishmania* avaliadas neste trabalho. Pelletier e colaboradores já haviam mostrado que Gal-3 se liga a *L. (L.) major*, enquanto que Gal-1 não é capaz de reconhecer este parasito (PELLETIER et al., 2003; PELLETIER; SATO, 2002). No presente trabalho, nós confirmamos que não é possível detectar a interação entre Gal-1/*L. (L.) major* e demonstramos que esta lectina também não interage com *L. (L.) amazonensis*. Os dados de ligação das duas galectinas estudas no presente trabalho com *L. (L.) amazonensis* e seus LPGs, demostram as suas atividades lectínicas distintas quanto ao reconhecimento de resíduos de galactose em oligossacarídeos, já descrita em outros trabalhos (SATO; HUGHES, 1992; SPARROW; LEFFLER; BARONDES, 1987). Além disso, quando analisada a constante de dissociação da ligação de Gal-1 com oligossacarídeo poli-β-galactose (Galβ1,3Lac), contido nas unidades de repetição do LPG de espécies de *Leishmania*, está constante apresenta valor 60 vezes maior quando comparado com a ligação da Gal-3 (PELLETIER et al., 2003), sugerindo que Gal-1 apresenta baixa afinidade por este oligossacarídeo. A análise estrutural de Gal-1 e Gal-4 demostrou que os sítios de reconhecimento de carboidrato de Gal-4 são mais extensos que o de Gal-1 (CAMBY, 2006; RUSTIGUEL et al., 2016). Isso nos sugere que devido aos CRDs de Gal-4 apresentarem-se mais extensos permitiria a acomodação de β-galactosídeos longos e modificados.

Como o LPG é o principal glicoconjugado da superfície de *Leishmania* (DE ASSIS et al., 2012; TURCO; DESCOTEAUX, 1992), capaz de promover a regulação da atividade leishmanicida de macrófagos infectados (BARBOSA et al., 2018; BRITTINGHAM; MOSSER, 1996; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012; SPATH et al., 2003) e pode ser reconhecido por outras galectinas (PELLETIER et al., 2003; PELLETIER; SATO, 2002), testamos a hipótese de LPGs purificados de duas cepas de *L. (L.) amazonensis* serem alvos moleculares para Gal-4. Como esperado, apenas a Gal-4 completa reagiu com os dois tipos de LPGs, de modo carboidrato dependente, como descrito para outras galectinas e LPGs de outras espécies de *Leishmania* (PELLETIER et al., 2003; PELLETIER; SATO, 2002). Além disso, demonstramos que a Gal-4 interage com este glicoconjugado parasitário complexo de modo independe dos seus polimorfismos estruturais intraespécies nos açúcares que se ramificam da cadeia lateral conservada de unidades de repetição de Gal(β1,4)Man(α1,3) (DE ASSIS et al., 2012; MAHONEY et al., 1999; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Estas características bioquímicas da interação entre Gal-4 e LPGs podem ser explicadas pelas alterações estruturais que glicoconjugado pode apresentar. Assim, o LPG da cepa PH8 tem

unidades repetitivas não substituídas e unidades de repetição com ramificações laterais ricas em glicose, enquanto a cepa Josefa mostra ramificações nas unidades de repetição substituídas ricamente em galactose (NOGUEIRA et al., 2016, 2017). Salientamos, que somos o primeiro grupo a demonstrar a interação entre Gal-4 humana e o LPG de *L. (L.) amazonensis*, independente de seu polimorfismo estrutural intraespécie.

Neste trabalho demonstramos que o tratamento com Gal-4 humana de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não alterou a fagocitose por macrófagos, mas favoreceu o controle da sobrevivência do parasito em macrófagos obtidos de camundongos BALB/c selvagens. Ao contrário do que foi apresentado na infecção de macrófagos com *L. (L.) major* tratada com Gal-9, no qual esta lectina reconhece *L. (L.) major* e a fagocitose por macrófagos é aumentada (PELLETIER et al., 2003). Enquanto que, após tratamento de *L. (L.) major* com Gal-3 e infecção de macrófagos, ocorre a clivagem de Gal-3 específica por este parasito, mas não altera a sua fagocitose por macrófagos (PELLETIER et al., 2003; PELLETIER; SATO, 2002; SATO et al., 2014). Nossos dados sugerem que a ligação de Gal-4 ao LPG de *L. (L.) amazonensis* pode favorecer os mecanismos leishmanicidas do macrófago. Gal-4 induz exacerbação da resposta inflamatória intestinal com consequente piora da colite crônica e retardo da recuperação da lesão intestinal aguda (HOKAMA et al., 2004), além de reconhecer e promover a morte de *E. coli* que expressa antígeno sanguíneo do grupo B (STOWELL et al., 2010). O nosso conjunto de resultados em associação com os dados de Stowell e colaboradores demonstram que a Gal-4 pode participar de mecanismos de defesa inata, podendo mediar a imunidade contra patógenos.

Sugerimos com base em nossos dados e outros que diferentes membros da família das galectinas atuem de forma multufuncional na patologia das leishmanioses, e ainda que essas funções possam ser espécie-específicas. Além disso, conseguimos demonstrar que o LPG, uma molécula do parasito crítica na relação parasita-hospedeiro, é alvo molecular para uma molécula do hospedeiro com propriedades imunoreguladoras. Desta forma, entendemos que este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos ou medidas que bloqueiem a transmissão de doenças transmitidas por vetores.

DESTAQUES

6. DESTAQUES

- Camundongos C57BL/6 deficientes ou não de Gal-1 não apresentaram diferença no perfil de desenvolvimento da lesão provocada por *L. (L.) amazonensis*, entretanto camundongos C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ apresentaram menor carga parasitária no sítio da infecção quando comparados com camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$;

- Macrófagos elicitados com tioglicolato ou macrófagos derivados de precursores da medula óssea obtidos de camundongos C57BL/6 Lgals1$^{+/+}$ e de C57BL/6 Lgals1$^{-/-}$ não apresentaram diferença no perfil de infecção experimental *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*;

- Camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentaram menor suscetibilidade à infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$;

- Macrófagos elicitados com tioglicolato obtidos de camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentaram menor suscetibilidade à infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* quando comparados com macrófagos BALB/c Lgals1$^{+/+}$;

- Tanto em BALB/c Lgals1$^{+/+}$ quanto em BALB/c Lgals1$^{-/-}$ há hiperplasia reacional nos linfonodos drenantes após infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*, entretanto apenas em camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ ocorre preservação da arquitetura dos centros germinativos;

- Camundongos BALB/c Lgals1$^{-/-}$ apresentaram menor produção de IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF-α no sítio da infecção e maior produção de IFN-γ no sítio da infecção por *L. (L.) amazonensis* quando comparados com camundongos BALB/c Lgals1$^{+/+}$;

- Gal-1 humana não se ligou a nenhuma espécie de *Leishmania* avaliada neste estudo;

- A forma completa de Gal-4 humana, e não seus domínios isolados, reconheceu formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo está interação é dependente da concentração e inibida parcialmente por lactose;

- A ligação de Gal-4 humana a *L. (L.) amazonensis* promoveu a aglutinação de formas promastigotas do parasito sem alterar a sua viabilidade;

- O LPG de *L. (L.) amazonensis* é um ligante da Gal-4 humana, sendo esta interação concentração dependente e sensível à lactose;

- Os polimorfismos estruturais intraespécie do LPG não alterou a capacidade de reconhecimento da Gal-4 humana;

- O tratamento de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4 exógena não alterou a fagocitose por macrófagos, mas favoreceu o controle da replicação intracelular do parasito em macrófagos BALB/c Lgals1$^{+/+}$;

- Gal-4 exógena acumula-se no sítio da infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Concluímos que a Gal-4, diferentemente da Gal-1, favorece a resposta de controle do hospedeiro na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. A participação da Gal-4 parece depender de interação direta com o parasito via o reconhecimento do LPG independente de seu polimorfismo estrutural intraespécie. A Gal-1 parece favorecer a progressão desta infecção experimental, de modo independente de uma interação direta com o parasito, e dependente da indução de um perfil de citocina desfavorável à resposta protetora do hospedeiro. Salientos que são necessárias futuras investigações para melhor entendimento do papel dessas lectinas na fisiopatologia da LT.

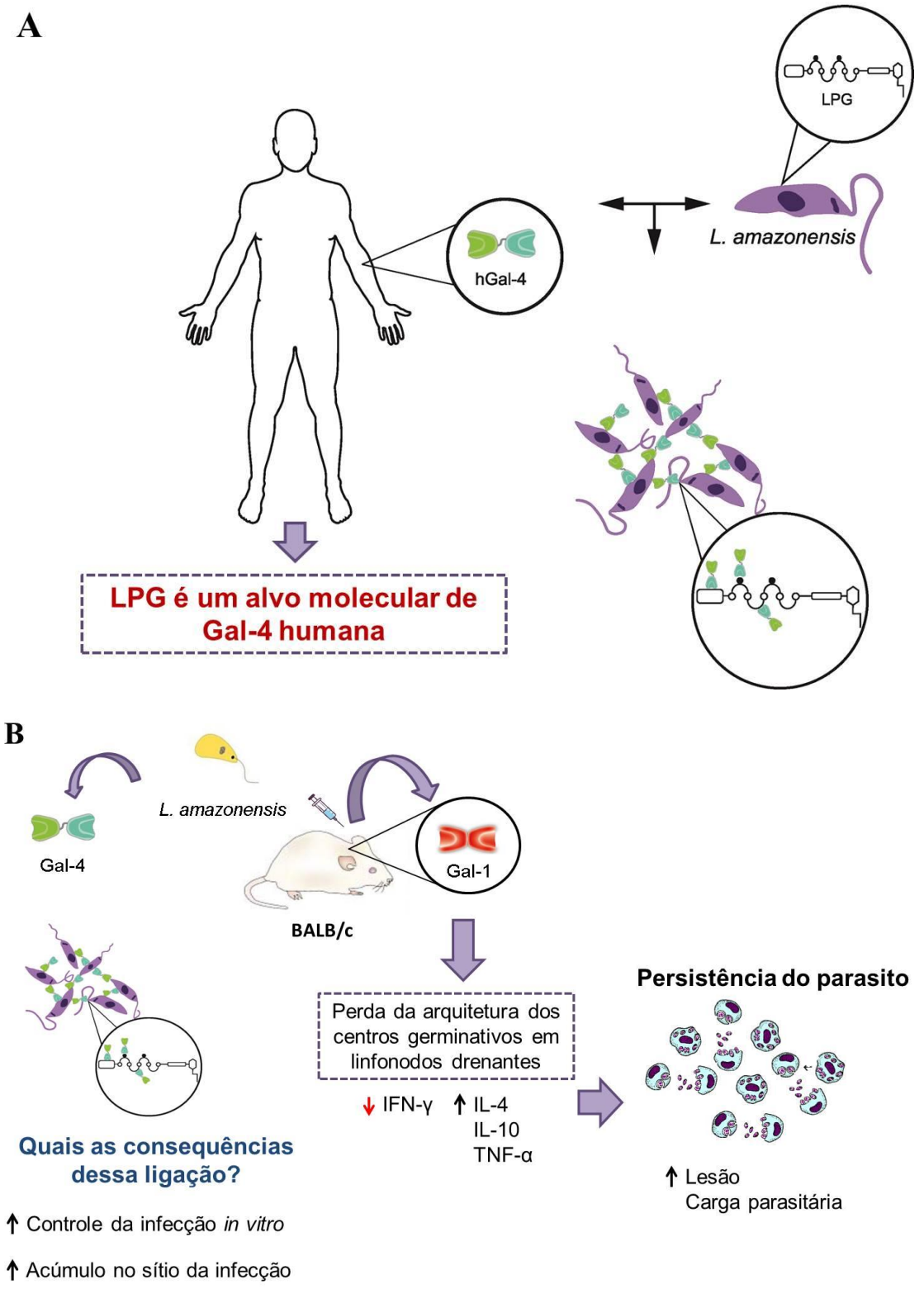

Figura 37. Esquema representativo da participação de Gal-1 e de Gal-4 no desenvolvimento da infecção experimental por *L. (L.) amazoensis*.

Referências

8. REFERÊNCIAS

AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to Leishmania amazonensis. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952–2959, 1993.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to Leishmania infection: Is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. APR, p. 1–13, 2012.

ANDERSEN, M. N. et al. Serum galectin-1 in patients with multiple myeloma: Associations with survival, angiogenesis, and biomarkers of macrophage activation. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 1977–1982, 2017.

ANDRÉ, S. et al. Combining glycocluster synthesis with protein engineering: An approach to probe into the significance of linker length in a tandem-repeat-type lectin (galectin-4). **Carbohydrate Research**, v. 389, n. 1, p. 25–38, 2014.

ARASU, A. et al. Bactericidal activity of fish galectin 4 derived membrane-binding peptide tagged with oligotryptophan. **Developmental and comparative immunology**, v. Jun, n. 71, p. 37–48, 2017.

ARTHUR, C. M. et al. **Evolving mechanistic insights into galectin functions**. [s.l: s.n.]. v. 1207

ASHFORD, R. W.; BETTINI, S. Ecology and Epidemiology: Old World. In: **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press Inc, 1987. p. 366–414.

BARBOSA, F. M. C. et al. Extracellular Vesicles Released by Leishmania (Leishmania) amazonensis Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. December, p. 3056, 2018.

BARONDES, S. H. et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**,

v. 76, n. 4, p. 597–8, 1994.

BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 1, n. 3, p. 267–79, 1995.

BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. LT americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, 2004.

BATES, P. A.; TETLEY, L. Leishmania mexicana: Induction of Metacyclogenesis by Cultivation of Promastigotes at Acidic pH. **Experimental Parasitology**, v. 76, n. 4, p. 412–423, 1993.

BEEBE, A. M. et al. Serial backross mapping of multiple loci associated with resistance to leishmania major in mice. **Immunity**, v. 6, n. 5, p. 551–557, 1997.

BENNIS, I. et al. Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis : a scoping review. **BMC public health**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2018.

BHAUMIK, P. et al. Galectin-3 Facilitates Neutrophil Recruitment as an Innate Immune Response to a Parasitic Protozoa Cutaneous Infection. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 630–640, 2013.

BLOIS, S. M. et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. **Nature Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1450–1457, 2007.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da LV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. **Manual De Vigilância Da LT**. [s.l: s.n.].

BRINCHMANN, M. F.; PATEL, D. M.; IVERSEN, M. H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2018, p.

9186940, 2018.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. Exploitation of the complement system by Leishmania promastigotes. **Parasitology Today**, v. 12, n. 11, p. 444–447, 1996.

BUNN, P. T. et al. Galectin-1 impairs the generation of anti-parasitic Th1 cell responses in the liver during experimental visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 2017.

BURLINA, S. et al. Is the placental proteome impaired in well-controlled gestational diabetes? **Journal of Mass Spectrometry**, 2019.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMBY, I. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, p. 137R–157R, 2006.

CAMPOS, M. B. et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (V.) braziliensis and Leishmania (L.) amazonensis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–22, 2018.

CANTON, J. et al. Disruption of the fusion of Leishmania parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 937–948, 2012.

CAO, Z. Q.; GUO, X. L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. **Protein and Cell**, v. 7, n. 5, p. 314–324, 2016.

CEDENO-LAURENT, F. et al. Galectin-1 Triggers an Immunoregulatory Signature in Th Cells Functionally Defined by IL-10 Expression. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3127–3137, 2012.

CHAUDHURI, G. et al. Surface Acid Proteinase (gp63) of Leishmania mexicana. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 13, p. 7483–89, 1989.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 43–52, 1988.

CHEN, J. et al. Expression profiling and microbial ligand binding analysis of galectin-4 in turbot (Scophthalmus maximus L.). **Fish & shellfish immunology**, v. Jan, n. 84, p. 673–679, 2019a.

CHEN, Q. et al. Immunogenomic analysis reveals LGALS1 contributes to the immune heterogeneity and immunosuppression in glioma. **International Journal of Cancer**, n. Jan 7, p. 1–14, 2019b.

COELHO-FINAMORE, J. M. et al. Leishmania infantum: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 3–4, p. 333–342, 2011.

CORREA, S. G. et al. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, v. 13, n. 2, p. 119–128, 2003.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F.-T.; VASTA, G. R. Galectins. In: VARKI, A. et al. (Eds.). . **Essentials of Glycobiology**. 3rd editio ed. New York: Cold Spring Harbor, 2017.

CUNNINGHAM, M. L. et al. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite Leishmania major by tetrahydrobiopterin. **Science**, v. 292, n. 5515, p. 285–287, 2001.

CYRINO, L. T. et al. In vivo and in vitro Leishmania amazonensis infection induces autophagy in macrophages. **Tissue & cell**, v. 44, n. 6, p. 401–8, 2012.

DARCIS, G. et al. Recurrence of visceral and muco-cutaneous leishmaniasis in a patient under immunosuppressive therapy. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 2–5, 2017.

DAVICINO, R. C. et al. Galectin-1–Driven Tolerogenic Programs Aggravate Yersinia enterocolitica Infection by Repressing Antibacterial Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 4, p. 1382–1392, 2017.

DAVID, C. V; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012.

DE CARVALHO, R. V. H. et al. Leishmania Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Reports**, v. 26, n. 2, p. 429–437, 2019.

DE CARVALHO VIVARINI, A. et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 12, p. 4162–4173, 2011.

DE SOUZA, V. L. et al. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and infection**, v. 2, n. 15, p. 1807–1815, 2000.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. Binding of Toxoplasma gondii glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 43, p. 32744–32750, 2010.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2–3, p. 341–352, 1999.

DIAS-BARUFFI, M. et al. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41282–41293, 2003.

EL-ASHRAM, S. et al. Early and late gene expression profiles of the ovine mucosa in response to Haemonchus contortus infection employing Illumina RNA-seq technology. **Parasitology International**, v. 66, n. 5, p. 681–692, 2017.

FERMINO, M. L. et al. Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and influences the course of Leishmania major infection. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 7, p. 1806–1817, 2013.

FERMINO, M. L. et al. Lack of galectin-3 increases Jagged1/Notch activation in bone marrow-derived dendritic cells and promotes dysregulation of T helper cell polarization. **Molecular Immunology**, v. 76, p. 22–34, 2016.

FORBES, J. R.; GROS, P.; DC, W. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1884–1892, 2003.

FORESTIER, C. L. et al. Imaging host cell-leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 4, p. 319–330, 2011.

FRANCO, L. H. et al. Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to Leishmania major infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 32, p. 13087–13096, 2017.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

GALUPPO, M. K. et al. CD100/Sema4D increases macrophage infection by Leishmania (Leishmania) amazonensis in a CD72 dependent manner. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–13, 2018.

GARÍN, M. I. et al. Galectin-1 : a key effector of regulation mediated by CD4 + CD25 + T cells Short title : Key role of galectin-1 in regulatory T cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2058–2066, 2007.

GITT, M. A. et al. Galectin-4 and galectin-6 are two closely related lectins expressed in mouse gastrointestinal tract. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 5, p. 2954–2960, 1998.

GLASER, T. A. et al. An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of Leishmania major. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 337–344, 1991.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. LT americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GOVENDER, M. et al. Deletion of Interleukin-4 Receptor Alpha-Responsive Keratinocytes in BALB/c Mice Does Not Alter Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 86, n. 12, p. 1–16, 2018.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.

GUIMARÃES, E. T. et al. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in Leishmania amazonensis infection of BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1219–1226, 2006.

HADARI, Y. R. et al. Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 7, p. 3447–53, 1995.

HANDMAN, E.; CEREDIG, R.; MITCHELL, G. F. Murine Cutaneous Leishmaniasts : Disease Patteiins in Intact and Nude Mice of Various Genotypes and Examination of Some

Differences Between. **The Australian journal of experimental biology and medical science**, v. 57, n. 1, p. 9–29, 1979.

HEINZEL, F. P. et al. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 5, p. 1505–9, 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmania donovani. v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HIMMELRICH, H. et al. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with Leishmania major is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 9, p. 4819–25, 2000.

HOKAMA, A. et al. Induced reactivity of intestinal CD4+T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation. **Immunity**, v. 20, n. 6, p. 681–693, 2004.

HONDOWICZ, B. D. et al. Maintenance of IL-12-responsive CD4+T cells during a Th2 response in Leishmania major-infected mice. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 7, p. 2007–2014, 2000.

HU, D. et al. Galectin 4 is a biomarker for early recurrence and death after surgical resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 1–6, 2019.

HUANG, M.-Y. et al. Pooling analysis reveals that galectin-1 is a reliable prognostic biomarker in various cancers. **Journal of Cellular Physiology**, n. Jan 7, p. 1–11, 2019.

HUFLEJT, M. E.; LEFFLER, H. Galectin-4 in normal tissues and cancer. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, n. 4, p. 247–255, 2003.

ILARREGUI, J. M. et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10.

Nature Immunology, v. 10, n. 9, p. 981–991, 2009.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–9, 2012.

JIANG, W. et al. Signature sequences for the galectin-4 subfamily. **IUBMB Life**, v. 48, n. 6, p. 601–605, 1999.

JONES, D. et al. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to Leishmania major. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3818–3824, 1998.

KALTNER, H. et al. Galectins: their network and roles in immunity/tumor growth control. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 147, n. 2, p. 239–256, 2017.

KAMHAWI, S. et al. A role for insect galectins in parasite survival. **Cell**, v. 119, n. 3, p. 329–341, 2004.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 187, n. 1089, p. 409–19, 1974.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: A historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1572, n. 2–3, p. 187–197, 2002.

KIM, S. W. et al. Abrogation of galectin-4 expression promotes tumorigenesis in colorectal cancer. **Cellular Oncology**, v. 36, n. 2, p. 169–178, 2013.

KOHATSU, L. et al. Galectin-3 induces death of Candida species expressing specific beta-1,2-linked mannans. **Journal of Immunology Research**, v. 177, n. 7, p. 4718–4726, 2006.

LAAF, D. et al. Galectin–Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology.

Trends in Biotechnology, p. 1–14, 2018.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The Leishmaniases in Biology and Medicine. Volume I. Biology and Epidemiology**. London: Academic Press Inc, 1987. p. 1–120.

LAPARA, N. J.; KELLY, B. L. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with Leishmania. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 1–9, 2010.

LE GROS, G. et al. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 3, p. 921–9, 1990.

LEFFLER, H. et al. Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7–9, p. 433–440, 2002.

LEVRONEY, E. L. et al. Novel Innate Immune Functions for Galectin-1: Galectin-1 Inhibits Cell Fusion by Nipah Virus Envelope Glycoproteins and Augments Dendritic Cell Secretion of Proinflammatory Cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 413–420, 2005.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013.

LIPOLDOVÁ, M. et al. Susceptibility to Leishmania major infection in mice : multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. **Genes and Immunity**, v. 1, n. 3, p. 200–206, 2000.

LIU, D. et al. Leishmania major phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3272–3283, 2009.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29–41, 2005.

MAHONEY, A. B. et al. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control Leishmania donovani-sand fly interactions. **Biochemistry**, v. 38, n. 31, p. 9813–9823, 1999.

MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J. et al. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2017.

MATHIEU, A. et al. Expression of galectins-1, -3 and -4 varies with strain and type of experimental colitis in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 6, p. 438–446, 2008.

MATTE, C.; DESCOTEAUX, A. Leishmania donovani amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3736–3743, 2010.

MAURER, M.; DONDJI, B.; VON STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 3, p. 137–146, 2009.

MCCONVILLE, M. J. et al. Structures of the glycoinositolphospholipids from Leishmania major. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 13, p. 7385–7394, 1990.

MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage. **The EMBO journal**, v. 11, n. 10, p. 3593–3600, 1992.

MCCONVILLE, M. J.; BACIC, A. The glycoinositolphospholipid profiles of two Leishmania major strains that differ in lipophosphoglycan expression. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 57–62, 1990.

MCGWIRE, B. S. et al. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis. Implications for parasite virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 8802–8809, 2002.

MEIER, C. L.; SVENSSON, M.; KAYE, P. M. Leishmania-Induced Inhibition of Macrophage Antigen Presentation Analyzed at the Single-Cell Level. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6706–6713, 2003.

MÉNDEZ, S. et al. Partial anaerobiosis induces infectivity of Leishmania infantum promastigotes. **Parasitology Research**, v. 85, n. 6, p. 507–509, 1999.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 2004.

MERCIER, S. et al. Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 121–129, 2008.

MITTRA, B. et al. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 401–416, 2013.

MITTRA, B.; ANDREWS, N. W. IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in Leishmania differentiation. **Trends in parasitology**, v. 10, p. 489–96, 2013.

MOCK, B. et al. Genetic control of Leishmania major infection in congenic, recombinant inbred and F2 populations of mice. **European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 20, n. 5, p. 335–348, 1993.

MOLLINEDO, F. et al. Selective fusion of azurophilic granules with Leishmania-containing phagosomes in human neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, p.

34528–34536, 2010.

MOLVIN, J. et al. Using a Targeted Proteomics Chip to Explore Pathophysiological Pathways for Incident Diabetes– The Malmö Preventive Project. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 272, 2019.

MOODY, S. F. et al. The structure of Leishmania major amastigote lipophosphoglycan. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 26, p. 18457–18466, 1993.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that Trypanosoma cruzi uses to adhere to the extracellular matrix and host cells mediated by human galectin-3. **FASEB Journal**, v. 16, n. 5, p. A898–A898, 2002.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The Leishmania-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.

NDJAMEN, B. et al. Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1480–1494, 2010.

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

NOGUEIRA, P. M. et al. Lipophosphoglycans from Leishmania amazonensis Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. p. 1–17, 2016.

NOGUEIRA, P. M. et al. Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect Leishmania amazonensis development in the permissive vectors Lutzomyia migonei and Lutzomyia longipalpis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

ODA, Y. et al. Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. **Journal of Biological Chemistry**,

v. 268, n. 8, p. 5929–5939, 1993.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunologic Research**, v. 56, n. 1, p. 163–171, 2013.

OLIVIER, M. et al. Leishmania virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.

OUELLET, M. et al. Galectin-1 Acts as a Soluble Host Factor That Promotes HIV-1 Infectivity through Stabilization of Virus Attachment to Host Cells. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4120–4126, 2005.

PACLIK, D. et al. Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 1–11, 2008.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The Role of Interleukin-10 in Susceptibility of BALB/c Mice to Infection with Leishmania mexicana and Leishmania amazonensis. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3705–3710, 2003.

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B. D.; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during Leishmania major infection. **Journal of immunology**, v. 165, n. 2, p. 896–902, 2000.

PELLETIER, I. et al. Specific recognition of Leishmania major poly-β-galactosyl epitopes by galectin-9: Possible implication of galectin-9 in interaction between L. major and host cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22223–22230, 2003.

PELLETIER, I.; SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by Leishmania major through species-specific polygalactose epitope. **Journal of Biological Chemistry**, v.

277, n. 20, p. 17663–17670, 2002.

PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 736–9, 1995.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.

POIRIER, F.; ROBERTSON, E. J. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. **Development**, v. 119, n. 4, p. 1229–1236, 1993.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1–Dependent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 7, p. 3311–3324, 2015.

PRINA, E. et al. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 11, p. 1307–1315, 2007.

PROUDFOOT, L. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10984–10989, 1996.

PUCADYIL, T. J. et al. Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: Implications in leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 145–152, 2004.

QUARESMA, P. F. et al. Distinct genetic profiles of Leishmania (Viannia) braziliensis associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1–9, 2018.

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

RABINOVICH, G. A.; ILARREGUI, J. M. Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: A challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 144–159, 2009.

RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, n. The Year in Immunology 2, p. 158–182, 2010.

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. Turning "sweet" on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 338–352, 2009.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The Regulation of Immunity to Leishmania Major. **Annual Review of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 151–177, 1995.

REMALEY, A. et al. Leishmania donovani: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. **Experimental parasitology**, v. 60, n. 3, p. 331–41, 1985.

REMALEY, A. T. et al. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O2- production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 18, p. 11173–11175, 1984.

RHODES, D. H. et al. Adipose tissue-specific modulation of galectin expression in lean and obese mice: Evidence for regulatory function. **Obesity**, v. 21, n. 2, p. 310–319, 2013.

ROBERTS, B. L. J. et al. Resistance to Leishmania major is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 9, p. 1705–10., 1997.

RODRÍGUEZ, N. E. et al. Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: A key sensory role in parasite signalling and development? **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 710–718, 2009.

RUBINSTEIN, N. et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection. **Cancer Cell**, v. 5, n. 3, p. 241–251, 2004.

RUSTIGUEL, J. K. et al. Recombinant expression, purification and preliminary biophysical and structural studies of C-terminal carbohydrate recognition domain from human galectin-4. **Protein expression and purification**, v. 118, p. 39–48, 2015.

RUSTIGUEL, J. K. et al. Full-length model of the human galectin-4 and insights into dynamics of inter-domain communication. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–13, 2016.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual review of microbiology**, v. 55, n. 2, p. 453–83, 2001.

SACKS, D. L. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular microbiology**, v. 3, n. 4, p. 189–96, 2001.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from Leishmania major promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 225–233, 1990.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 1984.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SARCINELLI, M. A. et al. Nanoradiopharmaceuticals for breast cancer imaging: Development, characterization, and imaging in inducted animals. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 5847–5854, 2016.

SARTER, K. et al. Detection and chromatographic removal of lipopolysaccharide in preparations of multifunctional galectins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, n. 1, p. 155–159, 2009.

SATELLI, A. et al. Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 4, p. 799–809, 2011.

SATO, S. et al. Role of Galectin-3 in the Initial Control of Leishmania Infection. **Critical Reviews in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 147–175, 2014.

SATO, S.; HUGHES, R. C. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6983–6990, 1992.

SCOTT, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 369–372, 1989.

SEDER, R. A. et al. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 21, p. 10188–10192, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8,

p. 423–431, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SOARES, R. P. P. et al. Leishmania tropica : intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different Phlebotomus species. **Experimental parasitology**, v. 107, n. 1–2, p. 105–114, 2004.

SOONG, L. et al. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with Leishmania amazonensis infection. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 11, p. 5374–83, 1997.

SOUZA CASTRO, L. et al. Characterization of Leishmania species from Central-West Region of Brazil. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1839–1845, 2018.

SPARROW, C. P.; LEFFLER, H.; BARONDES, S. H. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 15, p. 7383–7390, 1987.

SPATH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 16, p. 9536–9541, 2003.

STOWELL, S. R. et al. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, v. 14, n. 2, p. 157–167, 2004.

STOWELL, S. R. et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. **Nature Medicine**, v. 16, n. 3, p. 295–301, 2010.

SUCEN. **Leishmaniose: situação atual no Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-

endemias/programas/leishmaniose-tegumentar-americana/situacao-atual>. Acesso em: 2 jan. 2019.

SYPEK, B. J. P. et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 6, p. 1797–802, 1993.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling leishmania amazonensis infection in vitro: The role of LTB4 derived from human neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 4, p. 656–666, 2014.

THAN, N. G. et al. Severe preeclampsia is characterized by increased placental expression of galectin-1. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 7, p. 429–442, 2008.

THOMAIDOU, E. et al. Lymphatic Dissemination in Cutaneous Leishmaniasis Following Local Treatment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 4, p. 770–773, 2015.

TOSCANO, M. A. et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature Immunology**, v. 8, n. 8, p. 825–834, 2007.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. **Annual review of microbiology**, n. 46, p. 65–94, 1992.

TURCO, S. J.; SACKS, D. L. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in Leishmania major amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 91–99, 1991.

VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canine-isolated Leishmania (Leishmania) amazonensis from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–11, 2017.

VAN DEN BERG, T. K. et al. LacdiNAc-Glycans Constitute a Parasite Pattern for Galectin-3-Mediated Immune Recognition. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 1902–1907, 2004.

VAN DER LEIJ, J. et al. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: An important tool in the regulation of the immune response. **Journal of Pathology**, v. 204, n. 5, p. 511–518, 2004.

VAN KOOYK, Y.; RABINOVICH, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 593–601, 2008.

VANLOUBBEECK, Y. F. et al. Th1 Cells Induced by Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Mice Chronically Infected with. **Society**, v. 72, n. 8, p. 4455–4463, 2004.

VOLF, P. et al. Structural comparison of lipophosphoglycan from Leishmania turanica and L. major, two species transmitted by Phlebotomus papatasi. **Parasitology International**, v. 63, n. 5, p. 683–686, 2014.

WHITNEY, P. L.; POWELL, J. T.; SANFORD, G. L. Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. **The Biochemical journal**, v. 238, n. 3, p. 683–689, 1986.

WHO. **Leishmaniasis: Epidemiological situation**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 30 dez. 2018a.

WHO. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2016**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1>. Acesso em: 30 dez. 2018b.

WHO. **Leishmaniasis: Situation and trends**. Disponível em: <https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 30 dez. 2018a.

WHO. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis: 2017**. Disponível em: <http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html>.

WRIGHT, J. H. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer ("Delhi Sore"). **The Journal of Medical Research**, v. 10, n. 3, p. 472–482, 1903.

YANG, M.-L. et al. Galectin-1 Binds to Influenza Virus and Ameliorates Influenza Virus Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 85, n. 19, p. 10010–10020, 2011.

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 29, n. 5, p. 464–467, 2004.