UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RUDAN PARAISO GARCIA

**Influência da galectina-3 na resposta de neutrófilos a patógenos
periodontais**

BAURU
2016

RUDAN PARAISO GARCIA

**Influência da galectina-3 na resposta de neutrófilos a patógenos
periodontais**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Campanelli

Versão corrigida

BAURU
2016

G165i Garcia, Rudan Paraiso
 Influência da galectina-3 na resposta de
 neutrófilos a patógenos periodontais /
 Rudan Paraiso Garcia – Bauru, 2016.
 67 p. : il. ; 31cm.

 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
 Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Campanelli

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 019/2015
Data: 16/12/2015

CARTA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos portadores de periodontite, que um dia o fruto das pesquisas científicas possa aliviar seus sofrimentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Ana Paula Campanelli**, pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Roger Chammas** por ceder os animais utilizados nesta pesquisa.

À **Prof^a. Dr^a. Tarcília Aparecida Silva** por ceder as alíquotas de lipopolissacarídeos utilizadas.

À **Dr^a. Thais Helena Gasparoto** pelos ensinamentos e pela ajuda durante os experimentos.

Ao **Dr. Narciso Almeida Vieira** pela cordialidade e disposição em ajudar.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greghi** por abrir portas em outras disciplinas.

Ao **Prof. Dr. Caio Márcio Figueiredo** pela oportunidade de acesso a outras instituições de ensino.

À **Dr^a. Eliene Bim Bahia** pela disposição em ajudar.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro** por ajudar aos que lhe procuram.

À **Dalva Ribeiro de Oliveira** por ter se tornado uma amiga que poucos tem o privilégio de ter.

Aos amigos **André Luís da Silva, Nádia Ghinelli Amôr, Graziela Perri e Livia Maria de Melo** pela agradável convivência e pela ajuda durante todos os procedimentos experimentais.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** - Universidade de São Paulo, na pessoa de sua diretora, Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À **Comissão de Pós-Graduação da Área de Estomatologia e Biologia Oral** da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, na pessoa de sua coordenadora, Prof^a. Dr^a. Izabel Regina Fischer Rubira Bullen.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas** da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, na pessoa de seu chefe, Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet.

Ao **Laboratório de Microbiologia e Imunologia** da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, nas pessoas de seus docentes Prof^a. Dr^a. Ana Paula Campanelli e Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres.

À **CAPES** pelo apoio financeiro recebido na forma de bolsa de mestrado.

AGRADECIMENTOS AOS FAMILIARES

Aos meus pais, **Marcia Leonardo Pereira Paraiso Garcia** e **Luiz Ricardo Paraiso Garcia**, pelo apoio incondicional durante toda minha vida.

À **Taissa Paraiso Garcia** por ser a melhor irmã que alguém pode ter.

Ao meu avô, **Armando Leonardo Pereira**, pelos ensinamentos constantes ao longo do tempo em que permanecemos juntos e que será sempre um exemplo para mim.

À minha avó, **Miriam da Gama Leonardo Pereira**, pelo amor incondicional.

À **Angie Guggiari Niederberger** pelo companheirismo e apoio.

A **todos os meus familiares**, aos quais o espaço é curto para expressar o quanto admiro e quero bem.

*“O período de maior ganho de conhecimento e experiência é o
período de maior dificuldade na vida de cada um”*

Dalai Lama

RESUMO

Galectina-3, uma proteína que se liga a β -galactosídeos, é expressa por neutrófilos e inúmeras evidências indicam que esta molécula atua como uma possível reguladora da resposta imune. Sabe-se que galectina-3 ao ligar com LPS pode levar a formação de oligômeros, que podem alterar o limiar de ativação de células da resposta imune inata. Apesar de existirem diversos estudos que mostram a influência de galectina-3 na resposta de neutrófilos frente a componentes bacterianos, os resultados são em sua maioria contraditórios e inconclusivos. Para elucidar a influência da galectina-3 na resposta imune inata a patógenos periodontais, o presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* de neutrófilos, isolados de camundongos selvagens (WT) ou geneticamente deficientes de galectina-3 (Gal-3KO), previamente estimulados com LPS de *Aa* e *Pg*. Os resultados não evidenciaram diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas das culturas de neutrófilos provenientes de animais deficientes de galectina-3 e do grupo controle (WT). Contudo, a estimulação de neutrófilos com LPS por 18 horas levou a redução no número de UFC recuperadas das culturas, quando comparado com as culturas estimuladas com LPS por apenas 3 horas.

Palavras-chave: Galectina 3. Neutrófilos. Lipopolissacarídeos.

ABSTRACT

Influence of galectin-3 on neutrophil response to periodontal pathogens

Galectin-3, a protein that binds β -galactosides, is expressed by neutrophils and numerous evidences indicate that this molecule acts as a possible regulator of the immune response. It is known that galectin-3 binding to LPS can lead to the formation of oligomers and thus changing the activation threshold of cells of the innate immune response. Although there are several studies that show the influence of galectin-3 in neutrophil response against bacterial components, the results are conflicting and inconclusive in their majority. To elucidate the influence of galectin-3 in the innate immune response to periodontal pathogens, the present study evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of neutrophils, isolated from wild-type or galectin-3 deficient mice, previously stimulated with LPS of *Aa* and *Pg*. The results showed no significant differences in the number of colony forming units (CFU) recovered from cultured galectin-3 deficient neutrophils or control group. However, in a 18 hours time course of LPS stimulation, we observed reduction in the number of CFU, when compared to 3 hours of LPS stimulation.

Key words: Galectin 3. Neutrophils. Lipopolysaccharides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Resposta de neutrófilos WT e Gal-3KO estimulados ou não com LPS por 3 horas.....	38
Figura 2 - Resposta de neutrófilos WT e Gal-3KO estimulados ou não com LPS por 18 horas.....	39
Figura 3 - Influência de galectina-3 na resposta de neutrófilos.....	40
Figura 4 - Influência do tempo de estimulação com LPS na resposta de neutrófilos.....	41

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µL	Microlitro
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomytans</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i> , proteína ativadora 1
BALB/c	<i>Bagg Albino c Mice</i> , camundongo Bagg albino c
C57b/6	<i>C57 black 6 Mice</i> , camundongo C57 preto 6
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , agrupamento de diferenciação
CO ₂	Dióxido de Carbono
CRD	<i>Carbohydrate-Recognition Domain</i> , domínio de reconhecimento de carboidrato
Ec	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FM/USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Gravidade
Gal-3KO	<i>Galectin-3 Knockout</i> , camundongo geneticamente deficiente de galectina-3
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
IL	Interleucina
IRF3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i> , fator regulatório de interferon 3
Kg	Kilograma
KO	<i>Knockout</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide Biding Protein</i> , proteína ligante de polissacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
LPS-Aa	Lipopolissacarídeo de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomytans</i>
LPS-Ec	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
LPS-Pg	Lipopolissacarídeo de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
M1	<i>Classically Activated Macrophages</i> , macrófagos ativados classicamente
M2	<i>Alternatively Activated Macrophages</i> , macrófagos ativados alternativamente
mg	Miligrama

MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> , proteíno-quinases ativadas por mitógeno
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> , fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i> , armadilha extracelular de neutrófilos
NF- κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> , fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NO	<i>Nitric Oxide</i> , óxido nítrico
p	Valor-p
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> , padrão molecular associado a patógeno
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampão fosfato salino
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> , fosfoinositídeo 3-quinase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , receptor de reconhecimento de padrão
RPMI 1640	<i>Roswell Memorial Park Institute 1640 Medium</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , erro padrão da média
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> , transdutor de sinal e ativador de transcrição
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i> , receptor semelhante a Toll
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> , fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	15
PROPOSIÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	29
1. Cultura de <i>Escherichia coli</i>	31
2. Animais de experimentação	31
3. Eutanásia e extração da medula óssea	32
4. Isolamento de neutrófilos da medula óssea	32
5. Cultura de neutrófilos e estimulação <i>in vitro</i> por LPS	32
6. Estimulação de neutrófilos com <i>E. coli</i>	33
7. Análise de unidades formadoras de colônia	33
8. Análise estatística	33
RESULTADOS	35
1. Influência de galectina-3 na resposta de neutrófilos	37
2. Influência de LPSs de <i>Aa</i> , <i>Pg</i> e <i>E. coli</i> na resposta de neutrófilos	42
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	65

Introdução e Revisão de Literatura

Periodontite é a doença na qual a resposta inflamatória presente no periodonto leva a destruição irreversível dos tecidos de sustentação do órgão dentário (HEITZ-MAYFIELD, 2005).

Por ser uma enfermidade geralmente indolor e de lenta progressão a periodontite é muitas vezes negligenciada por seus portadores (KIM; AMAR, 2006). Por outro lado, a periodontite é uma doença extremamente relevante do ponto de vista da saúde pública, visto que atinge 47% da população adulta dos EUA e 65% da população brasileira (EKE et al., 2012; SUSIN et al., 2005).

Ao longo de décadas, muitos estudos foram dedicados a elucidar os processos envolvidos com o início e desenvolvimento da periodontite. Embora ainda permaneçam mais dúvidas do que certezas, os avanços obtidos nos permitem definir alguns conceitos fundamentais sobre sua etiologia. Primeiramente, deve-se reconhecer que a destruição óssea característica desta doença se dá por intermédio da resposta inflamatória presente no periodonto e não devido a ação direta de bactérias presentes no biofilme dentário (GRAVES, 2008; PRESHAW, 2008; VAN DYKE; SERHAN, 2003). Em segundo lugar, deve-se ter em mente que, por mais que se utilize técnicas adequadas de higiene oral, a superfície dentária estará colonizada por uma comunidade microbiana que pode induzir uma resposta imunológica nos tecidos gengivais subjacentes (TELES et al., 2012). Portanto a periodontite ocorre devido a ruptura da homeostasia dos tecidos periodontais frente ao biofilme dentário (DARVEAU, 2010).

Com base nessas evidências, os modelos atuais consideram a periodontite como uma doença multifatorial, na qual não existe um único fator capaz de isoladamente desencadear a doença, sendo necessária a presença de diversos fatores para que ocorra a alteração de uma resposta inflamatória homeostática, para uma patológica e destrutiva (HEATON; DIETRICH, 2012; PAGE; KORNMAN, 1997). Deve-se ter em mente que estes fatores também interagem entre si, causando efeitos que não estão totalmente elucidados, porém, de forma simplificada, pode-se montar uma sequência dos eventos necessários para o desenvolvimento da periodontite. Primeiramente, o desafio microbiano representado pelas bactérias e seus produtos presentes no biofilme dentário desencadeiam a resposta inflamatória nos tecidos periodontais do hospedeiro. Esta, por sua vez, compreende a ativação de leucócitos e outras células constituintes do periodonto, como fibroblastos e

células epiteliais, que liberam uma série de citocinas, metaloproteinases e outros mediadores inflamatórios. Então estes produtos da resposta inflamatória alteram o metabolismo do tecido ósseo e conjuntivo do periodonto, fazendo com que a reabsorção óssea seja maior que neoformação, o que, com o decorrer do tempo, se manifesta clinicamente como perda irreversível do tecido ósseo, que é o fenômeno determinante da periodontite (DARVEAU, 2010; GARLET, 2010).

As características da resposta imune e metabolismo tecidual são únicas para cada indivíduo, constituindo parte de seu fenótipo, ou seja são determinadas pelas suas singularidades genéticas assim como por modificadores ambientais e adquiridos. Como sabe-se que nem todos os indivíduos desenvolvem a periodontite, conclui-se que um fenótipo susceptível é fator fundamental para o desenvolvimento da periodontite (VAN DYKE; SHEILESH, 2005).

Outro fator fundamental para o desenvolvimento desta doença é o biofilme dentário. A composição do biofilme oral de um indivíduo é única e pode variar de sítio para sítio. Entre os fatores que determinam a sua composição, destacam-se as exposições ambientais e fenótipo do indivíduo, assim como os hábitos de higiene oral do hospedeiro (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Sabe-se que, embora indivíduos altamente susceptíveis sejam capazes de desenvolver a doença com níveis mínimos de biofilme, a ausência de hábitos adequados de higienização oral é fundamental para o desenvolvimento da periodontite, pois permite que ocorra a maturação da comunidade bacteriana do biofilme (BARTOLD; VAN DYKE, 2013; HAJISHENGALLIS, 2015).

Durante o começo da formação do biofilme, a superfície dentária é colonizada majoritariamente por cocos aeróbicos gram-positivos, que possuem pouco potencial patogênicos, porém fornecem condições ecológicas necessárias para o estabelecimento de outras espécies. Por fim, o biofilme maduro abriga as condições necessárias para que bacilos gram-negativos, como *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), integrem o biofilme. Embora estas bactérias não sejam capazes de isoladamente causar a periodontite, suas presenças estão altamente correlacionadas com lesões avançadas desta doença (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Estas bactérias possuem diversas características que as permitem sobreviver às defesas do hospedeiro, como a clivagem de componentes do complemento (MAEKAWA et al., 2014). Além disso se beneficiam de uma resposta

inflamatória exarcebada, pois obtêm nutrição a partir de componentes do exsudato inflamatório, assim como usufruem de menor competição por outras espécies bacterianas mais susceptíveis a resposta inflamatória (HAJISHENGALLIS, 2014). Entre os diversos componentes bacterianos capazes de estimular a resposta inflamatória, o lipopolissacarídeo (LPS) é um potente ativador da resposta imune inata (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

A resposta imune inata compreende um dos primeiros mecanismos de defesa do organismo frente aos agentes infecciosos. Nos tecidos periodontais, ela compreende a barreira física representada pelo epitélio juncional e sulcular, assim como pelo exsudato e infiltrado inflamatório, compostos respectivamente por mediadores e células do sistema imunológico (DARVEAU, 2010; DUNSCHE et al., 2002; GARLET, 2010). As primeiras células a serem recrutadas da circulação sanguíneas, para os sítios inflamatórios, são os neutrófilos. Estes constituem o maior percentual da população de leucócitos sanguíneos e são capazes de reconhecer bactérias, ativando uma série de mecanismos antimicrobianos, como a fagocitose, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET, do inglês *neutrophil extracellular traps*) e liberação de grânulos contendo moléculas antimicrobianas, como a enzima mieloperoxidase (MPO) e defensinas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Os neutrófilos possuem papel de destaque na homeostasia periodontal, visto que indivíduos com deficiência congênita no recrutamento destas células para sítios inflamatórios apresentam grande destruição periodontal (MOUTSOPOULOS et al., 2014). Por outro lado, o acúmulo excessivo de neutrófilos pode favorecer a destruição periodontal (ESKAN et al., 2012).

Além disso, os neutrófilos, assim como outras células do sistema imune, reconhecem patógenos através de diversos receptores como, por exemplo, receptor semelhante a Toll (TLR, do inglês *toll-like receptor*) que reconhecem padrões moleculares associado ao patógeno (PAMP, do inglês *pathogen associated molecular pattern*). Um exemplo de PAMP é o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias que estimula, via TLR4, a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*), que promove a produção de citocinas inflamatórias, como por exemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor-alpha*). O estímulo de

neutrófilos com LPS, no entanto, pode induzir a secreção de IL-10, uma citocina com características imunossupressoras (LEWKOWICZ et al., 2016).

Neutrófilos apresentam potente atividade microbicida através da produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio e enzimas proteolíticas (ex. mieloperoxidase). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que constitui cerca de 5% da proteína total de neutrófilos e está presente nos grânulos citoplasmáticos em concentrações muito elevadas. A MPO catalisa reações com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para gerar oxidantes citotóxicos extremamente potentes como ácido hipocloroso (HOCl) e o radical tirosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl (EISERICH, J. P. et al., 1998). A formação de derivados reativos de oxigênio pode ocorrer através da ativação da enzima fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase presente nas membranas citoplasmática e fagolisossômica, e ativada por diferentes estímulos, entre eles sinais de TLRs (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013).

Além dos TLRs, recentemente tem sido demonstrada a importância de lectinas presentes na membrana das células da resposta imune inata na regulação da atividade de neutrófilos e do sistema imune (VASTA, 2009).

Lectinas são todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD, do inglês *Carbohydrate-Recognition Domain*) e que se ligam especificamente a açúcares, de maneira reversível (DRICKAMER; TAYLOR, 1993). As lectinas ligam-se, seletivamente, às glicanas da superfície de muitas células (RUTISHAUSER; SACHS, 1975). Essa ligação modifica a fisiologia da membrana e/ou induz sinalização celular de maneira a induzir diversas respostas bioquímicas (SHARON; LIS, 1993).

Galectinas constituem uma família de lectinas animais evolutivamente conservadas que exibem similaridade no CRD e afinidade por glicoconjugados ricos em N-acetil-lactosamina (RABINOVICH, 1999). Galectina-3 é provavelmente o membro mais estudado da família de galectinas (OCHIENG; FURTAK; LUKYANOV, 2004). A galectina-3 é uma proteína ligante de β -galactosídeo e está envolvida em vários processos biológicos. Sua estrutura é formada por um domínio carboxi-terminal que corresponde ao CRD; e por um pequeno domínio amino-terminal de

ligação protéica, que contém sequências repetidas ricas em prolina, tirosina e glicina (BARONDES et al., 1994; KUKLINSKI; PROBSTMEIER, 1998).

Galectinas podem estar presentes em diversos compartimentos celulares tais como: núcleo, citosol e membrana plasmática, assim como no meio extracelular (BARONDES et al., 1994; HO; SPRINGER, 1982; KUKLINSKI; PROBSTMEIER, 1998). Galectina-3 foi inicialmente descrita por ser expressa na superfície de macrófagos elicitados com tioglicolato (HO; SPRINGER, 1982) e, posteriormente, demonstrou-se que esta molécula é expressa em uma grande variedade de tipos celulares, tais como eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos, e células epiteliais (FLOTTE; SPRINGER; THORBECKE, 1983; FODDY; STAMATOGLLOU; HUGHES, 1990; HAINES et al., 1983; NABARRA; PAPIERNIK, 1988; TRUONG et al., 1993).

As funções biológicas de galectina-3 incluem a regulação do crescimento celular, apoptose, transformações neoplásicas e respostas inflamatórias (HSU et al., 2000). Estudos *in vivo* com camundongos verificaram o aumento de sua expressão tecidual em modelos de inflamação e infecção (FARNWORTH et al., 2008; HSU et al., 2000; NIEMINEN et al., 2008; SATO et al., 2002). Dados indicam que galectina-3 medeia a quimiotaxia de monócitos e macrófagos (SANO et al., 2000), angiogênese em células endoteliais (NANGIA-MAKKER et al., 2000), modulação da apoptose de linfócitos (YANG; HSU; LIU, 1996), inibição da produção de IL-5 por eosinófilos (CORTEGANO et al., 1998), e aumento da produção de NADPH oxidase e superóxidos por neutrófilos (KARLSSON et al., 1998; YAMAOKA et al., 1995). Alguns estudos realizados *in vivo* com camundongos geneticamente deficientes de galectina-3 (Gal-3KO, do inglês *Galectin-3 Knockout*), indicam que a somatória de seus efeitos é pro-inflamatória (COLNOT et al., 1998; HSU et al., 2000).

Durante a resposta inflamatória frente um agente infeccioso, as lectinas localizadas no meio extracelular podem interagir com carboidratos presentes na superfície dos micro-organismos ou secretadas por eles. Embora todas as galectinas se liguem à β -galactose, os diversos membros desta família de proteínas diferem quanto a capacidade de se ligar aos sacarídeos associados com a galactose. Portanto, cada galectina possui especificidade para diferentes oligossacarídeos (AHMED et al., 2002; HIRABAYASHI et al., 2002) e, entre os diversos glico-conjugados que galectina-3 pode se ligar, os LPSs recebem especial atenção pois são potentes ativadores da resposta imune inata. A interação entre os LPSs e os

neutrófilos pode ser alterada por moléculas solúveis no meio extracelular, como por exemplo a família das lectinas, na qual se inclui a galectina-3 (VASTA, 2009).

LPS é um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas que é reconhecido como PAMP pelas células da resposta imune inata através de receptores de membrana, destacando-se os receptores semelhantes a Toll (TLR, do inglês *Toll-Like Receptor*) e CD14. Especificamente, galectina-3 pode se ligar a LPS tanto através da cadeia N-terminal que se une a lipídeo A, quanto a partir da cadeia C-terminal que interage com β -galactosídeo presente, no núcleo ou antígeno O dos LPSs (TRIANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2002). Convém ressaltar que diferentes espécies bacterianas apresentam variações estruturais do LPS, e, de acordo com a presença de β -galactose e outros sacarídeos, podem ou não interagir com galectina-3 (FERMINO et al., 2011; KATO; UZAWA; ISHIHARA, 2009; LI et al., 2008).

Portanto, devido alto número de processo celulares na qual está envolvida, o estudo da influência de galectina-3 no reconhecimento de patógenos e subsequente ativação de leucócitos da resposta imune inata se torna de difícil interpretação por modelos *in vivo*, sendo a maioria dos estudos realizados *in vitro* com culturas de células isoladas.

Estudos que visaram estudar a influência de galectina-3 na resposta de leucócitos à LPS obtiveram resultados divergentes. Em um destes, observou-se que galectina-3 reage com o LPS no meio extracelular diminuindo o limiar necessário para ativar neutrófilos e que a oligomerização de galectina-3 possui papel importante neste processo (FERMINO et al., 2011). Especula-se que a oligomerização de galectina-3 permite a dissolução de agregados de LPS, facilitando o seu reconhecimento por neutrófilos, assim como torna mais fácil a formação de agrupamentos na superfície dos mesmos. Outros estudos confirmaram o efeito amplificador de galectina-3 na resposta de neutrófilos (ALMKVIST et al., 2004; ALMKVIST et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2005; KARLSSON et al., 1998; NIEMINEN et al., 2007; YAMAOKA et al., 1995).

Por outro lado, foi demonstrado que a galectina-3 é um regulador negativo da ativação de macrófagos por LPS. Uma possível explicação para tal divergência é a diferença nas concentrações de LPS e galectina-3 empregadas nos estudos, o que poderia afetar a oligomerização de galectina-3 e a disponibilidade de LPS para reconhecimento por macrófagos (LI et al., 2008).

Animais Gal-3KO infectados com *Streptococcus pneumoniae* desenvolvem pneumonia mais severa do que animais WT devido a menor ativação de neutrófilos, verificada pela menor fagocitose e maior apoptose por estas células (FARNWORTH et al., 2008). Enquanto após inoculação de tioglicolato por via intraperitoneal nestes animais, a resposta observada é menor do que aquela em animais WT (HSU et al., 2000). Podendo, então, a função da galectina-3 ser tanto benéfica quanto destrutiva em diferentes processos inflamatórios.

A biologia de galectina-3 em macrófagos parece ser bem mais complexa do que em neutrófilos, pois, quando monócitos se diferenciam em macrófagos, ocorre um grande aumento da expressão de galectina-3 por estas células (LIU et al., 1995). Além disso, os macrófagos expressam em sua superfície a glicoproteína CD98, que se liga a galectina-3 e é capaz de desencadear sinais intracelulares através da ativação de PI3K (DONG; HUGHES, 1997; HENDERSON et al., 2004; RINTOUL et al., 2002).

Tal via de sinalização permite que galectina-3, através da ligação com CD98, regule a polarização de macrófagos. Constatou-se que a galectina-3 pode direcionar macrófagos para um perfil de ativação alternativo (M2) e que a ativação alternativa mediada por IL-4/IL-13 aumenta a produção de galectina-3, enquanto a ativação clássica (M1) por LPS diminui a produção da mesma. Indo além, verificaram que galectina-3 é necessária para a ativação alternativa adequada, visto tanto macrófagos de animais Gal-3KO quanto macrófagos de animais selvagens (WT, do inglês *Wild Type*) cultivados em conjunto com um inibidor específico de galectina-3 extracelular apresentavam uma ativação alternativa deficiente. Concluindo-se então que existe um ciclo de retroalimentação na ativação alternativa de macrófagos dependente de galectina-3 (MACKINNON et al., 2008).

Por sua vez, em linfócitos T a galectina-3 induz a apoptose destas células através da interação com os receptores de superfície CD29 e CD7 (FUKUMORI et al., 2003).

As variedades de LPSs de diferentes espécies bacterianas podem interagir ou não com a galectina-3. Recentemente, através da análise da ligação dos LPSs de dois patógenos periodontais com galectina-3, verificou-se que o LPS presente na bactéria *Aa* era capaz de se ligar a galectina-3 enquanto o da *Pg* não (KATO et al., 2009).

Como sabemos que ambos LPSs são capazes de ativar neutrófilos através de TLR (CAMPANELLI et al., 2003; COATS et al., 2009; ELAHI et al., 2001), especulamos que galectina-3 está envolvida na ativação diferencial de neutrófilos frente a diferentes patógenos periodontais, fato que nos motivou a realizar este estudo.

Proposição

Baseado no exposto, o objetivo do presente estudo é avaliar a influência de galectina-3 na atividade antimicrobiana de neutrófilos ativados ou não com LPSs de diferentes patógenos periodontais.

Material e Métodos

1. Cultura de *Escherichia coli*

Para os ensaios de atividade antimicrobiana, foram utilizadas amostras de *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 (*E. coli*) provenientes do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP. A cepa de *E. coli* foi cultivada em caldo BHI (DifcoTM) à 37°C por 18 horas. Em seguida, a cultura bacteriana foi homogeneizada, transferida para um tubo de polipropileno e centrifugada a 4000RPM/5min/4°C (Centrifuga 5810R - Eppendorf[®]). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 20 mL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) e novamente centrificada a 4000RPM/5min/4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de RPMI 1640 (Gibco[®]), sendo as células contadas em Câmara de Neubauer (Bright Lined Improved Neubauer - New Optik[®]) no aumento de 1000X através de microscópio óptico (CH-2 - Olympus[®]) e a suspensão foi ajustada para 1×10^7 bactérias por mL. A pureza da cultura foi confirmada pela morfologia celular em esfregaços corados pelo Método de Gram visualizados em microscópio óptico e pela morfologia colonial em Ágar MacConkey (DifcoTM).

2. Animais de experimentação

O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP (Protocolo: 019/2015). Foram utilizados camundongos isogênicos (*Mus musculus*) BALB/c do tipo selvagem (WT) e camundongos BALB/c-Lgals3 geneticamente deficiente da Galectina-3 (Gal-3KO), machos e fêmeas, com idade de oito semanas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FM/USP (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Roger Chammas). Os animais foram alocados, ao acaso, em microisoladores e mantidos em condições apropriadas com livre acesso à água e dieta padrão no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP.

3. Eutanásia e extração da medula óssea

Os camundongos sofreram eutanásia através da injeção intraperitoneal de barbitúrico tiopental sódico [200mg/kg] (Thiopentax[®] - Cristália[®]) e anestésico local cloridrato de lidocaína [10mg/kg] (Lidovet[®] - Bravet[®]). Após a confirmação da eutanásia pela cessão dos sinais vitais, os animais foram dissecados em ambiente estéril por fluxo laminar e as tíbias e os fêmures removidos. Após a extração de músculos e tendões, os ossos foram colocados em etanol 70% por 2 minutos e lavados com RPMI 1640. As extremidades dos ossos foram cortadas e as medulas removidas através da injeção de 5 mL de meio RPMI 1640 pelo espaço medular sobre tubos de polipropileno de 15 mL (Falcon[®] - Corning[®]).

4. Isolamento de neutrófilos da medula óssea

As medulas foram homogeneizadas através de pipetagem repetitiva. A suspensão celular foi então centrifugada a 350g/10min/4°C e o precipitado ressuspenso em 6 mL de RPMI 1640 a temperatura ambiente e colocado em um tubo de 15mL contendo 4 mL de Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich[®]) sobre 4 mL de Histopaque[®]-1119 (Sigma-Aldrich[®]) e centrifugado a 450g/20min/24°C. Os neutrófilos depositados sobre o Histopaque 1119 foram coletados, lavados duas vezes com 10 mL de meio RPMI 1640. O número de neutrófilos obtidos foi determinado e a morfologia verificada através de coloração de Turk por meio de microscopia óptica.

5. Cultura de neutrófilos e estimulação *in vitro* por LPS

Neutrófilos (1×10^6) obtidos conforme descrito acima foram cultivados em placas de 24 poços (Costar[®] - Corning[®]) contendo 1 mL de RPMI 1640 completo [contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco[®]), 2 mM de L-glutamina (Gibco[®]), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco[®])]. As células foram estimuladas pela presença ou ausência de LPS de *Escherichia coli* (LPS-Ec, Invivogen[®]), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (LPS-Aa, FDCY4), *Porphyromonas gingivalis* (LPS-Pg, W83) na concentração de 100 ng/mL por 3 ou 18 horas (MADEIRA et al., 2013). Os

LPS-Aa e LPS-Pg foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Tarcília Aparecida Silva.

6. Estimulação de neutrófilos com *Escherichia coli*

Após a estimulação de neutrófilos conforme o descrito acima, foi adicionado aos poços de cultura a suspensão de *E. coli* na proporção de uma bactéria por neutrófilo, ou seja, 1×10^6 por poço. Em seguida, as placas de 24 poços contendo as culturas de neutrófilos e *E. coli* foram mantidas em incubadora umidificada (Forma Series II – Thermo-Fisher[®]) a 37°C e 5% de CO₂ por 3 horas. Decorrido este período, os conteúdos dos poços foram coletados e utilizados para determinar o número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

7. Análise de unidades formadoras de colônia

Após a coleta de 1 mL de cada poço das culturas de neutrófilos e *E. coli* em um microtubo (Eppendorf[®]), as suspensões de células foram serialmente diluídas através da transferência de 100µL para um microtubo contendo 900µL de PBS estéril, e assim sucessivamente até a diluição de 10^{-3} . Em seguida, 100µL do sobrenadante original e de todas as diluições foram semeados em placas de Petri descartáveis de 90mm de diâmetro (J. Prolab[®]) contendo ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 14 horas. Após este período, as placas foram avaliadas para a contagem de UFC/mL.

8. Análise estatística.

Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (SEM, do inglês *Standard Error of the Mean*) dos resultados obtidos. A análise estatística foi realizada através de múltiplos testes t utilizando o programa GraphPad Prisma 6 (GraphPad Software[®]). Valores de $p < 0.05$ foram considerados como significativos.

Resultados

1. Influência de galectina-3 na resposta de neutrófilos.

Para determinar a influência da galectina-3 na resposta de neutrófilos, essas células foram isoladas da medula óssea de camundongos WT e Gal-3KO e estimuladas ou não com LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomytans* (LPS-Aa), *Porphyromonas gingivalis* (LPS-Pg) e *Escherichia coli* (LPS-Ec) por 3 ou 18 horas. Durante os procedimentos de extração das medulas óssea não foram percebidas diferenças anatômicas entre os ossos das duas linhagens de animais utilizadas e, após a purificação das células, foram obtidos número semelhantes de neutrófilos entre camundongos WT ($1,84 \pm 0,17 \times 10^7$ células) e Gal-3KO ($1,4 \pm 0,2 \times 10^7$ células).

Após a estimulação, os neutrófilos foram desafiados com *E. coli* e avaliado o número de UFC. Os resultados evidenciaram a presença de colônias circulares, convexas, com bordas lisas e coloração rosa, que indica a fermentação de lactose (**Figuras 1 e 2**). Tais resultados são compatíveis com a morfologia colonial de *E. coli*. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa no número de UFC entre os grupos (**Figuras 3 e 4**). Os resultados também permitiram analisar a Influência de LPSs de Aa, Pg e *E. coli* na resposta de neutrófilos. Não foram observadas diferenças significativas nos números de UFC entre os grupos, após a estimulação de neutrófilos com LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomytans* (LPS-Aa), *Porphyromonas gingivalis* (LPS-Pg) e *Escherichia coli* (LPS-Ec) (**Figura 3**). O que indicaria não haver diferenças significativa entre a resposta de neutrófilos isolados de animais geneticamente deficiente de galectina-3 e neutrófilos isolados de animais selvagens, após a estimulação com LPS (**Figura 3**).

Figura 1. Resposta de neutrófilos WT e Gal-3KO estimulados ou não com LPS por 3 horas. Colônias de *E. coli* em meio Ágar MacConkey obtidas a partir do sobrenadante da cultura de neutrófilos de camundongo selvagem (WT) e deficientes de galectina-3 (Gal-3KO), após 14 horas de incubação à 37°C. Imagem representativa de um experimento e diluído 1000X.

Figura 2. Resposta de neutrófilos WT e Gal-3KO estimulados ou não com LPS por 18 horas. Colônias de *E. coli* em meio Ágar MacConkey obtidas a partir do sobrenadante da cultura de neutrófilos de camundongo selvagem (WT) e deficientes de galectina-3 (Gal-3KO), após 14 horas de incubação à 37°C. Imagem representativa de um experimento e diluído 1000X.

Figura 3. Influência de galectina-3 na resposta de neutrófilos. Neutrófilos isolados de camundongos WT ou Gal-3KO foram estimulados in vitro pela adição de LPS por 3 horas (A) ou 18 horas (B). Após os períodos de estímulo, foi realizada cultura com *Escherichia coli* (Ec) e as UFC/mL determinadas. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem de UFC de 3 placas para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados foram avaliados por ANOVA e múltiplos testes t.

Figura 4. Influência do tempo de estimulação com LPS na resposta de neutrófilos. Neutrófilos isolados de camundongos WT ou Gal-3KO foram estimulados in vitro pela adição de LPS por 3 horas ou 18 horas. Após os períodos de estímulo, foi realizada cultura com *Escherichia coli* (Ec) e as UFC/mL determinadas. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem de UFC de 3 placas para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados foram avaliados por ANOVA e múltiplos testes t. *p <0,05

2. Influência do tempo de estímulo com LPS na resposta de neutrófilos.

Ao comparar o efeito de um mesmo estímulo por diferentes períodos de tempo, foi verificado menor número de UFC/mL nas culturas estimuladas por 18 horas em relação as estimuladas por 3 horas, tanto em animais WT quanto nos Gal-3KO. Porém, na maioria dos estímulos esta diferença não foi estatisticamente significativa, sendo apenas na resposta dos neutrófilos de animais selvagens mantidos em cultura sem estímulo por 3 ou 18 horas (**Figura 4**).

Discussão

Os neutrófilos são as principais células efetoras da resposta inflamatória aguda, tendo como função primária a eliminação de patógenos extracelulares. Para desempenhar esta função, possuem em seu arsenal uma série de mecanismos, como a fagocitose, liberação de NETs, produção de moléculas antimicrobianas e citocinas. Além disso, os neutrófilos podem interagir com outras células da resposta imune inata e adaptativa, ativando ou regulando sua função. Por fim, verifica-se a extrema importância do estudo da resposta de neutrófilos frente a patógenos, visto que estão envolvidos na patogênese de uma série de doenças, inclusive a periodontite (MANTOVANI et al., 2011).

Entre os diversos componentes de bactérias gram-negativas que induzem a resposta imune, o LPS recebe destaque pela sua acentuada virulência. Apesar de existirem diferenças estruturais entre essas moléculas de diferentes espécies de micro-organismos, o LPS das bactérias estudadas no presente trabalho, *Aa*, *Pg* e *E. coli*, ativam células do sistema imune através da interação com moléculas como o TLR2 e TLR4 (DARVEAU et al., 2004; GELANI et al., 2009; PARK, O. J. et al., 2015; POLTORAK et al., 1998; SHIMAZU et al., 1999). Apesar da grande variação estrutural das moléculas de LPS, os TLR4 podem reconhecer uma grande variedade dos mesmos através da formação de complexos TLR4-MD-2 (PARK, B. S. et al., 2009). Por serem moléculas anfipáticas, os LPSs formam grandes agregados em meio aquoso, dificultando o reconhecimento por TLR. Proteínas acessórias expressas pelo hospedeiro, como a proteína ligante de LPS (LBP, do inglês *lipopolysaccharide binding protein*) e CD14, facilitam o reconhecimento de LPS através da extração de monômeros de LPS de grandes agregados micelares e transferência dos mesmos para TLR. A ativação dos receptores TLR4 pode desencadear diversas vias de sinalização, como proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*), proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*), transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT, do inglês *signal transducer and activator of transcription*), fator regulatório de interferon 3 (IRF3, do inglês *interferon regulatory factor 3*) entre outras. Uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator nuclear kappa B (NF-κB, do inglês *nuclear factor kappa B*) que ao se translocar ao núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (Cruz-Machado, 2010). Após a interação com esses receptores na superfície da célula, é

desencadeada uma cascata de sinalização nos neutrófilos, que culmina em sua ativação, caracterizada pelo aumento da produção de citocinas, maior geração de espécies reativas de oxigênio, elevação da expressão de receptores em sua superfície e maior capacidade fagocítica (HAYASHI; MEANS; LUSTER, 2003). Portanto, a análise da interação destas moléculas com os LPSs de diferentes espécies bacterianas é importante para avaliar a capacidade das mesmas em ativar células do sistema imune (PARK, B. S.; LEE, 2013).

A galectina-3, presente tanto na superfície de neutrófilos quanto na forma solúvel no meio extracelular, é capaz de interagir com o antígeno O dos LPSs através de seu CRD. Como o antígeno O é uma região de grande variabilidade entre espécies bacterianas, a galectina-3 é uma molécula interessante de ser estudada, pois pode estar envolvida na resposta diferencial de neutrófilos a patógenos específicos. Em relação aos microorganismos envolvidos na patogênese das doenças periodontais, a galectina-3 é capaz de se ligar ao LPS de *Aa*, mas não ao de *Pg* (KATO et al., 2009).

Diferenças entre a estrutura dos LPSs destes microorganismos podem afetar o reconhecimento dos mesmos por leucócitos, influenciando a resposta destas células (NIJLAND; HOFLAND; VAN STRIJP, 2014). Sabe-se que *E. coli* é uma das bactérias gram-negativas mais bem estudadas na literatura científica, sendo abundante as informações acerca da estrutura de seu LPS. Enquanto *Aa* e *Pg* apresentam papel de destaque na microbiologia das doenças periodontais, sendo seus LPSs reconhecidos como importantes fatores de virulência destas bactérias. Através da análise *in vitro*, é possível avaliar a resposta de células específicas frente ao estímulo com LPSs isolados de diferentes bactérias. Após a ativação de neutrófilos *in vitro* estas células apresentam maior capacidade de matar ou inibir o crescimento bacteriano. Tanto através de processos dependentes do contato direto com a bactéria, por exemplo a fagocitose, como independentes, como na degranulação e liberação de moléculas antimicrobianas (MARCHI et al., 2014; NORDENFELT; TAPPER, 2011; SEGAL, 2005; SIMARD et al., 2011; WEISS et al., 1978).

No presente modelo de estudo, foi avaliada a influência dos LPSs de *Aa*, *Pg* e *E. coli* na resposta de neutrófilos murinos. Os resultados não encontraram diferenças significativas quanto a ativação dos neutrófilos, avaliada através da morte de *E. coli*, após ativação com LPS de *Aa*, *Pg* e *E. coli*. Apesar de não existirem

outros estudos avaliando a influência de destes LPSs através desta metodologia, existem relatos que avaliam outras facetas da ativação dos neutrófilos por estes LPS ou outras células da resposta imune. Neutrófilos isolados da corrente sanguínea de humanos saudáveis ou portadores de periodontite estimulados *in vitro* com LPS de *Aa*, *Pg* e *E. coli* por 6 ou 12 horas e avaliados quanto a produção das moléculas antimicrobianas LL-37, α -defensinas 1-3 e óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), apresentam ativação semelhante quando estimulados com LPS de *Pg* e *E. coli*, enquanto o LPS de *Aa* apresentou diferenças significativas (MARIANO et al., 2012). Ainda, o estudo de células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos sanguíneos e posteriormente estimuladas com LPS de *Aa*, *Pg* e *E. coli*, apresentou resultados semelhantes quanto a produção das citocinas fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Factor-Alpha*), IL-10, e expressão dos marcadores de superfície CD40, CD80 e CD83 após o estímulo com os LPSs de *Aa* e *Pg*, enquanto o estímulo por *E. coli* apresentou resultados divergentes (MAHANONDA et al., 2006). No presente estudo, verificamos que as diferenças estruturais entre as moléculas de LPS não induzem ativação diferencial de neutrófilos, quando consideramos a habilidade destas células em matar micro-organismos. Adicionalmente é possível supor que, na concentração empregada, o LPS das diferentes bactérias testadas ativou neutrófilos murinos independente da presença de galectina-3. Não sendo possível estabelecer uma correlação e inferir que a presença ou ausência de galectina-3 em neutrófilos murinos poderia influenciar na produção dos parâmetros analisados em estudos anteriores. Tal fato, aliado a diferenças nos parâmetros utilizados para analisar a resposta de neutrófilos, dificulta a comparação direta dos resultados.

Em camundongos, a indução de reabsorção óssea periodontal através da injeção de local de LPS, apresenta diferentes consequências dependendo da espécie bacteriana da qual o LPS foi isolado. O LPS de *Aa* é indutor mais potente de reabsorção óssea e produção de IL-1 neste modelo experimental (NISHIDA et al., 2001). Constatando, assim, que o tipo de LPS desempenha papel importante no desenvolvimento da reabsorção óssea periodontal em camundongos. Porém não foi estudado qual o papel de diferentes células do hospedeiro neste processo, justificando a busca pela melhor compreensão do efeito de diferentes LPSs na resposta de neutrófilos, visto que estas células podem estar diretamente envolvidas no processo através do qual os LPS induzem a reabsorção óssea. Portanto pode-se

verificar que o reconhecimento de LPS apresenta papel importante na resposta de neutrófilos frente a patógenos periodontais. O papel dos LPSs de *Aa* e *Pg* ainda não está bem estabelecido na literatura, visto que as resposta entre camundongos e humanos não é a mesma, e cada tipo celular pode apresentar uma resposta diferente ao LPS proveniente de cada uma destas bactérias.

A influência da galectina-3 na resposta de leucócitos a patógenos não é bem elucidada. Em algumas células galectina-3 apresenta função pró-inflamatória, como aumento da quimiotaxia e fagocitose por macrófagos (SANO et al., 2000). Enquanto em outras sua ação é anti-inflamatória, como na indução da apoptose em linfócitos T (FUKUMORI et al., 2003). Especificamente em relação a ativação neutrófilos, as evidências não são claras a respeito da influência da galectina-3. Foi constatado que a galectina-3 aumenta a explosão respiratória (MISHRA et al., 2013), inibe a apoptose de neutrófilos após a eliminação de agente infeccioso (MISHRA et al., 2013), assim como está relacionada ao recrutamento de neutrófilos para pulmões infectados por *Streptococcus* de forma independente de integrina, agindo como molécula ponte entre neutrófilos e células endoteliais (Sato et al., 2002; Nieminen et al., 2007).

Através da utilização de animais Gal-3KO e WT, observou-se não haver diferenças significativas na atividade de neutrófilos quanto à morte, *in vitro*, de *E. coli* mantidas em cultura com os neutrófilos. Também verificou-se que camundongos Gal-3KO são altamente resistentes a infecção pela bactéria Gram-negativa *Salmonella* (LI et al., 2008). Apesar do mecanismo de proteção não ter sido demonstrado, especula-se que a galectina-3 se liga ao PAMPs impedindo seu reconhecimento pelos leucócitos, resultando em supressão da resposta imune e crescimento bacteriano desenfreado (LI et al., 2008). Camundongos Gal-3KO também demonstraram melhor arquitetura pulmonar e sobrevida aumentada após a infecção por *Francisella novicida* (MISHRA et al., 2013). Apesar, de não termos realizado ensaios *in vivo*, os resultados do presente estudo também evidenciaram que a ausência de galectina-3 não prejudica o controle do número de bactérias Gram-negativas.

Um dos possíveis fatores que podem explicar a variabilidade observada nestes estudos é a metodologia empregada para avaliar a influência de galectina-3. Quando utilizados animais KO, a ausência desta proteína pode estar afetando outros processos celulares não analisados. Enquanto a adição de galectina-3 recombinante

em culturas *in vitro* normalmente ocorre com concentrações muito maiores desta proteína do que encontrado *in vivo*. Além disso, dependendo da quantidade de LPS em comparação com de a galectina-3, esta última poderia inibir o reconhecimento de LPS sequestrando-os em agregados, de forma análoga ao que ocorre com LBP e CD14 (GUTSMANN et al., 2001; WURFEL; HAILMAN; WRIGHT, 1995). Como discutido, os resultados obtidos pelo presente estudo não demonstraram diferenças significativas em relação a influência da galectina-3 e LPS de diferentes bactérias na ativação de neutrófilos. Convém ressaltar que a partir destes dados não pôde-se concluir que não existem diferenças entre os parâmetros analisados. Curiosamente, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o número de UFC/mL após a cultura de *E. coli* com neutrófilos mantidos em cultura por 3 horas ou 18 horas sem estímulo algum. Como os neutrófilos são células lábeis, possuindo meia-vida de poucas horas na corrente sanguínea, em um tempo de cultura de 18 horas sem a adição de estímulos, é de se esperar que um número elevado destas células tenham morrido antes mesmo da adição de bactérias à cultura (SAVERYMUTTU et al., 1985; SCHEEL-TOELLNER et al., 2004).

A morte de neutrófilos na cultura pode ocorrer por mecanismos diversos, como apoptose, necrose e piroptose. Apesar da diferença entre os mecanismos intracelulares envolvidos nestes processos, em todos ocorre a liberação de agentes antimicrobianos no meio de cultura, possivelmente tornando-o extremamente tóxico para bactérias (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; GEERING; SIMON, 2011). Portanto a diminuição de UFC/mL observada pode ser devido ao maior acúmulo de produtos antimicrobianos no meio de cultura e não devido a uma maior ativação dos neutrófilos presentes. Visto que a diminuição do número de UFC/mL foi menor no tempo de 18 horas em todos os parâmetros experimentais analisados, sendo ainda mais acentuada nos poços em que não houve estímulo com LPS.

Novos estudos se fazem necessários para confirmar e elucidar os efeitos observados, assim como para estudar outras facetas da resposta de neutrófilos ainda não analisadas. Diversos ensaios e análises podem ser realizadas a partir da metodologia empregada no presente trabalho. A dosagem de citocinas e moléculas antimicrobianas presentes nos meios de cultura previamente a adição das bactérias ajudaria isolar os efeitos causados pelo estímulo com LPS, daqueles decorrentes a adição de *E. coli* viáveis. Ensaios para avaliar a fagocitose e formação de NETs poderia avaliar quais mecanismos estão causando a morte das bactérias. Enquanto

a realização de ensaio de apoptose possibilitaria avaliar a viabilidade dos neutrófilos após os diferentes períodos de estímulo e após a cultura com *E. coli*.

A compreensão da influência da galectina-3 na resposta de neutrófilos a patógenos periodontais é importante porque estas células apresentam papel central na patogenia da periodontite. Além disso, a identificação de proteínas capazes de reconhecer bactérias específicas, pode levar ao desenvolvimento de novas terapias que possibilitem a destruição de um patógeno alvo sem afetar a microbiota indígena do hospedeiro.

Conclusões

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas a respeito da influência de galectina-3 e de LPSs *Aa*, *Pg* e *E. coli* na resposta de neutrófilos. Por outro lado, foi possível verificar que o aumento do tempo de cultura de neutrófilos antes da adição de *E. coli* aumentou a morte destas bactérias quando não houve estímulo prévio por LPS. Mais estudos são necessários para elucidar este fenômeno.

Referências Bibliográficas

AHMED, H. et al. Novel carbohydrate specificity of the 16-kDa galectin from *Caenorhabditis elegans*: binding to blood group precursor oligosaccharides (type 1, type 2, Talpha, and Tbeta) and gangliosides. **Glycobiology**, v. 12, n. 8, p. 451-61, Aug 2002.

ALMKVIST, J. et al. Newcastle disease virus neuraminidase primes neutrophils for stimulation by galectin-3 and formyl-Met-Leu-Phe. **Exp Cell Res**, v. 298, n. 1, p. 74-82, Aug 1 2004.

ALMKVIST, J. et al. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. **Infect Immun**, v. 69, n. 2, p. 832-7, Feb 2001.

BARONDES, S. H. et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 597-8, Feb 25 1994.

BARTOLD, P. M.; VAN DYKE, T. E. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontol 2000**, v. 62, n. 1, p. 203-17, Jun 2013.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 2, p. 99-109, Feb 2009.

CAMPANELLI, A. P. et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis**, v. 187, n. 9, p. 1496-505, May 1 2003.

COATS, S. R. et al. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 11, p. 1587-99, Nov 2009.

COLNOT, C. et al. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. **Immunology**, v. 94, n. 3, p. 290-6, Jul 1998.

CORTEGANO, I. et al. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. **J Immunol**, v. 161, n. 1, p. 385-9, Jul 1 1998.

CRUZ-MACHADO. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFkB. *Revista da Biologia*, v. 4, p. 40-3, Jun 2010.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 481-90, Jul 2010.

DARVEAU, R. P. et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5041-51, Sep 2004.

DONG, S.; HUGHES, R. C. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). **Glycoconj J**, v. 14, n. 2, p. 267-74, Feb 1997.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annu Rev Cell Biol**, v. 9, p. 237-64, 1993.

DUNSCHE, A. et al. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. **Eur J Oral Sci**, v. 110, n. 2, p. 121-4, Apr 2002.

EISERICH, J. P. et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 393-7, Jan 22 1998.

EKE, P. I. et al. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **J Dent Res**, v. 91, n. 10, p. 914-20, Oct 2012.

ELAHI, S. et al. Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. **Immunology**, v. 104, n. 4, p. 447-54, Dec 2001.

ESKAN, M. A. et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. **Nat Immunol**, v. 13, n. 5, p. 465-73, May 2012.

FARNWORTH, S. L. et al. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. **Am J Pathol**, v. 172, n. 2, p. 395-405, Feb 2008.

FERMINO, M. L. et al. LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26004, 2011.

FERNANDEZ, G. C. et al. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. **Glycobiology**, v. 15, n. 5, p. 519-27, May 2005.

FLOTTE, T. J.; SPRINGER, T. A.; THORBECKE, G. J. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. **Am J Pathol**, v. 111, n. 1, p. 112-24, Apr 1983.

FODDY, L.; STAMATOGLOU, S. C.; HUGHES, R. C. An endogenous carbohydrate-binding protein of baby hamster kidney (BHK21 C13) cells. Temporal changes in cellular expression in the developing kidney. **J Cell Sci**, v. 97 (Pt 1), p. 139-48, Sep 1990.

FUKUMORI, T. et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Res**, v. 63, n. 23, p. 8302-11, Dec 1 2003.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **J Dent Res**, v. 89, n. 12, p. 1349-63, Dec 2010.

GEERING, B.; SIMON, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 9, p. 1457-69, Sep 2011.

GELANI, V. et al. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Periodontol**, v. 80, n. 12, p. 2010-9, Dec 2009.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1585-91, Aug 2008.

GUTSMANN, T. et al. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. **Infect Immun**, v. 69, n. 11, p. 6942-50, Nov 2001.

HAINES, K. A. et al. Staining of Langerhans cells with monoclonal antibodies to macrophages and lymphoid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 11, p. 3448-51, Jun 1983.

HAJISHENGALLIS, G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. **Mol Oral Microbiol**, v. 29, n. 6, p. 248-57, Dec 2014.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 1, p. 30-44, Jan 2015.

HAYASHI, F.; MEANS, T. K.; LUSTER, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2660-9, Oct 1 2003.

HEATON, B.; DIETRICH, T. Causal theory and the etiology of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 58, n. 1, p. 26-36, Feb 2012.

HEITZ-MAYFIELD, L. J. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 32 Suppl 6, p. 196-209, 2005.

HENDERSON, N. C. et al. CD98hc (SLC3A2) interaction with beta 1 integrins is required for transformation. **J Biol Chem**, v. 279, n. 52, p. 54731-41, Dec 24 2004.

HIRABAYASHI, J. et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 232-54, Sep 19 2002.

HO, M. K.; SPRINGER, T. A. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. **J Immunol**, v. 128, n. 3, p. 1221-8, Mar 1982.

HSU, D. K. et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **Am J Pathol**, v. 156, n. 3, p. 1073-83, Mar 2000.

KARLSSON, A. et al. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. **Blood**, v. 91, n. 9, p. 3430-8, May 1 1998.

KATO, T.; UZAWA, A.; ISHIHARA, K. Inhibitory effect of galectin-3 on the cytokine-inducing activity of periodontopathic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* endotoxin in splenocytes derived from mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 57, n. 1, p. 40-5, Oct 2009.

KIM, J.; AMAR, S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. **Odontology**, v. 94, n. 1, p. 10-21, Sep 2006.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013.

KUKLINSKI, S.; PROBSTMEIER, R. Homophilic binding properties of galectin-3: involvement of the carbohydrate recognition domain. **J Neurochem**, v. 70, n. 2, p. 814-23, Feb 1998.

LEWKOWICZ, N. et al. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 2, p. 364-78, Mar 2016.

LI, Y. et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2781-9, Aug 15 2008.

LIU, F. T. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **Am J Pathol**, v. 147, n. 4, p. 1016-28, Oct 1995.

MACKINNON, A. C. et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2650-8, Feb 15 2008.

MADEIRA, M. F. et al. Platelet-activating factor receptor blockade ameliorates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice. **Infect Immun**, v. 81, n. 11, p. 4244-51, Nov 2013.

MAEKAWA, T. et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 6, p. 768-78, Jun 11 2014.

MAHANONDA, R. et al. The effects of *Porphyromonas gingivalis* LPS and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LPS on human dendritic cells in vitro, and in a mouse model in vivo. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 24, n. 4, p. 223-8, Dec 2006.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, Aug 2011.

MARCHI, L. F. et al. In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. **Int Immunopharmacol**, v. 18, n. 2, p. 228-35, Feb 2014.

MARIANO, F. S. et al. Antimicrobial peptides and nitric oxide production by neutrophils from periodontitis subjects. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 11, p. 1017-24, Nov 2012.

MISHRA, B. B. et al. Galectin-3 functions as an alarmin: pathogenic role for sepsis development in murine respiratory tularemia. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59616, 2013.

MOUTSOPOULOS, N. M. et al. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 229, p. 229ra40, Mar 26 2014.

NABARRA, B.; PAPIERNIK, M. Phenotype of thymic stromal cells. An immunoelectron microscopic study with anti-IA, anti-MAC-1, and anti-MAC-2 antibodies. **Lab Invest**, v. 58, n. 5, p. 524-31, May 1988.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 156, n. 3, p. 899-909, Mar 2000.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 5, p. 349-61, May 2013.

NIEMINEN, J. et al. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. **J Biol Chem**, v. 282, n. 2, p. 1374-83, Jan 12 2007.

NIEMINEN, J. et al. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2466-73, Feb 15 2008.

NIJLAND, R.; HOFLAND, T.; VAN STRIJP, J. A. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. **Mar Drugs**, v. 12, n. 7, p. 4260-73, Jul 2014.

NISHIDA, E. et al. Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **J Periodontal Res**, v. 36, n. 1, p. 1-8, Feb 2001.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 90, n. 2, p. 271-84, Aug 2011.

OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p. 527-35, 2004.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 9-11, Jun 1997.

PARK, B. S.; LEE, J. O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Exp Mol Med**, v. 45, p. e66, 2013.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-5, Apr 30 2009.

PARK, O. J. et al. Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces the expression of chemokines MCP-1, MIP-1alpha, and IP-10 via similar but

distinct signaling pathways in murine macrophages. **Immunobiology**, v. 220, n. 9, p. 1067-74, Sep 2015.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, Dec 11 1998.

PRESHAW, P. M. Host response modulation in periodontics. **Periodontol 2000**, v. 48, p. 92-110, 2008.

RABINOVICH, G. A. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 8, p. 711-21, Aug 1999.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RINTOUL, R. C. et al. Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 8, p. 2841-52, Aug 2002.

RUTISHAUSER, U.; SACHS, L. Cell-to-cell binding induced by different lectins. **J Cell Biol**, v. 65, n. 2, p. 247-57, May 1975.

SANO, H. et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J Immunol**, v. 165, n. 4, p. 2156-64, Aug 15 2000.

SATO, S. et al. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. **J Immunol**, v. 168, n. 4, p. 1813-22, Feb 15 2002.

SAVERYMUTTU, S. H. et al. The kinetics of 111indium distribution following injection of 111indium labelled autologous granulocytes in man. **Br J Haematol**, v. 61, n. 4, p. 675-85, Dec 1985.

SCHEEL-TOELLNER, D. et al. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2557-64, Oct 15 2004.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci Am**, v. 268, n. 1, p. 82-9, Jan 1993.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v. 189, n. 11, p. 1777-82, Jun 7 1999.

SIMARD, J. C. et al. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. **J Immunol**, v. 186, n. 6, p. 3622-31, Mar 15 2011.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol** **2000**, v. 38, p. 135-87, 2005.

SUSIN, C. et al. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, p. 123-9, Feb 2005.

TELES, F. R. et al. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. **J Periodontal Res**, v. 47, n. 1, p. 95-104, Feb 2012.

TRANTAFILOU, M.; TRANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends Immunol**, v. 23, n. 6, p. 301-4, Jun 2002.

TRUONG, M. J. et al. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 12, p. 3230-5, Dec 1993.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **J Dent Res**, v. 82, n. 2, p. 82-90, Feb 2003.

VAN DYKE, T. E.; SHEILESH, D. Risk factors for periodontitis. **J Int Acad Periodontol**, v. 7, n. 1, p. 3-7, Jan 2005.

VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 424-38, Jun 2009.

WEISS, J. et al. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. **J Biol Chem**, v. 253, n. 8, p. 2664-72, Apr 25 1978.

WURFEL, M. M.; HAILMAN, E.; WRIGHT, S. D. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. **J Exp Med**, v. 181, n. 5, p. 1743-54, May 1 1995.

YAMAOKA, A. et al. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. **J Immunol**, v. 154, n. 7, p. 3479-87, Apr 1 1995.

YANG, R. Y.; HSU, D. K.; LIU, F. T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 13, p. 6737-42, Jun 25 1996.

Anexos

ANEXO A - Carta de Aprovação do Comitê de Ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de BauruComissão de Ética no Ensino e Pesquisa em
Animais

CEEPA-Proc. Nº 019/2015

Bauru, 16 de dezembro de 2015.

Senhora Professora,

Em atenção às alterações efetuadas no projeto de pesquisa intitulado "*Influência da galectina-3 na resposta imune inata a patógenos periodontais*", que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), informamos que foram analisadas por um relator e **aprovadas ad referendum** desta pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), nesta data, conforme dados na tabela abaixo.

Esta comissão solicita que ao final da pesquisa seja enviado relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Vigência do projeto:	Dezembro/2015 a Fevereiro/2016
Espécie/Linhagem:	Camundongos - BALB/c e BALB/c-Lgals3
Nº de animais:	n = 28 (7 machos e 7 fêmeas, de cada espécie)
Peso/Idade	25 g/6-8 semanas
Sexo:	Machos e fêmeas
Origem:	Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FM/USP

Atenciosamente,

Profª Drª Cássia Maria Fischer Rubira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof.a Dr.a Ana Paula Campanelli
Docente do Departamento de Ciências BiológicasAl. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: ceepa@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>