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 para obtenção do Título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.
Orientada: Anna Karoline Aguiar Fleuri
Orientador: 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.

152 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 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 ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.1 Camundongos ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.2 Obtenção dos camundongos BALB/c deficientes em Gal-1 **Erro! Indicador não definido.**
3.3 Cultivo de espécies de *Leishmania* ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.4 Infecção experimental dos camundongos ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.5 Avaliação do desenvolvimento da lesão em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.6 Quantificação da carga parasitária por diluição limitante **Erro! Indicador não definido.**

3.7 Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real (RT-PCR)..... **Erro! Indicador não definido.**

3.8 Análise histopatológica do sítio da infecção e linfonodo drenante**Erro! Indicador não definido.**

3.9 Dosagem de citocinas por ensaio de Milliplex® ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.10 Obtenção e purificação de Gal-1 recombinante humana**Erro! Indicador não definido.**

3.11 Obtenção e purificação de Gal-4 recombinante humana**Erro! Indicador não definido.**

3.12 PCR de colônia de bactéria *E. coli* produtora de Gal-4 humana recombinante... **Erro! Indicador não definido.**

3.13 Identificação de Gal-4 por Western blot..... **Erro! Indicador não definido.**

3.14 Obtenção de Gal-1 e de Gal-4 humana recombinantes derivatizadas com isotiocianato de fluoresceína ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.15 Análise da atividade lectínica de Gal-1 e de Gal-4 recombinantes humana por ensaio de hemaglutinação ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.16 Marcação de Gal-4 com ^{99m}Tc ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.17 Avaliação da eficiência da radiomarcação de Gal-4hr-^{99m}Tc**Erro! Indicador não definido.**

3.18 Aquisição de imagens por micro SPECT/CT ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.19 Ensaio de ligação de Gal-1-FITC e Gal-4-FITC na superfície de espécies de *Leishmania* ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.19 Ensaio de ligação dos domínios isolados de Gal-4 na superfície de *L. (L.) amazonensis*..... **Erro! Indicador não definido.**

3.19 Avaliação da viabilidade de *L. (L.) amazonensis* após o tratamento com Gal-4..... ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.20 Avaliação morfológica de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com Gal-4..... **Erro! Indicador não definido.**

3.21 Extração e purificação de Lipofosfoglicana de *L. (L.) amazonensis***Erro! Indicador não definido.**

3.22 Ensaio de ligação de Gal-4 à lipofosfoglicana de *L. (L.) amazonensis* ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.23 Preparo de macrófagos..... **Erro! Indicador não definido.**

3.23.1 Diferenciação de macrófagos a partir de precursores da medula óssea ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.23.2 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos elicitados por tioglicolato ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.24 Tratamento dos macrófagos com Gal-4 recombinante humana e infecção experimental ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.25 Tratamento de *L. (L.) amazonensis* com Gal-4 recombinante humana e infecção experimental ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.26 Análise estatística ..... **Erro! Indicador não definido.**

4. RESULTADOS ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1 Efeito da deficiência de Gal-1 no desenvolvimento da infecção experimental em camundongos de fundo genético C57BL/6 ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.2 Efeito da ausência de Gal-1 no desenvolvimento da infecção experimental em camundongos de fundo genético BALB/c ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3 Efeito da deficiência de Gal-1 na restrição da infecção experimental em macrófagos **Erro! Indicador não definido.**

4.4 Análise histológica do sítio da infecção e de linfonodo drenante de camundongos BALB/c deficientes ou não em Gal-1 ..... **Erro! Indicador não definido.**

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 **Erro! Indicador não definido.**

4.6 Obtenção e purificação de Gal-4 humana recombinante **Erro! Indicador não definido.**

4.7 Obtenção e purificação de Gal-1 humana recombinante **Erro! Indicador não definido.**

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

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

4.10 Gal-4 humana recombinante reconhece Lipofosfoglicanos purificados de *L. (L.) amazonensis* ..... **Erro! Indicador não definido.**

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 ..... **Erro! Indicador não definido.**
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* ..... **Erro! Indicador não definido.**
5. DISCUSSÃO..... **Erro! Indicador não definido.**
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).

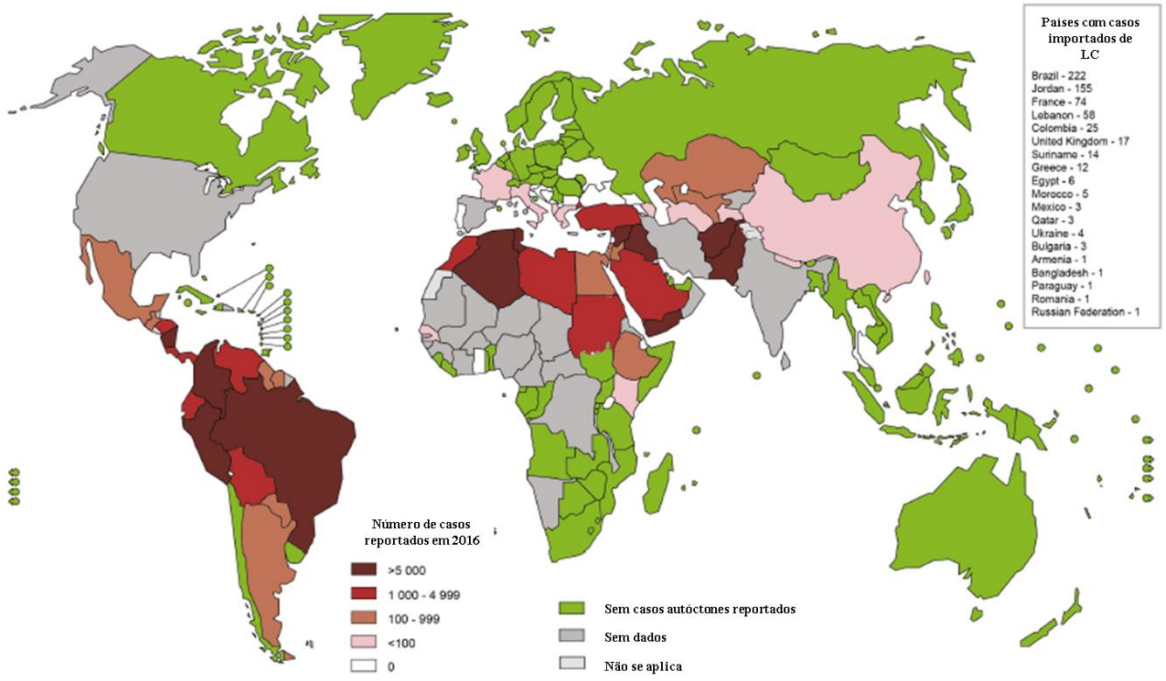

Figura 1. Situação epidemiológica mundial da LT. Extraído e adaptado de Organização Mundial de Saúde, OMS (WHO, World Health Organization), 2016. LC: Leishmaniose cutânea.

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).

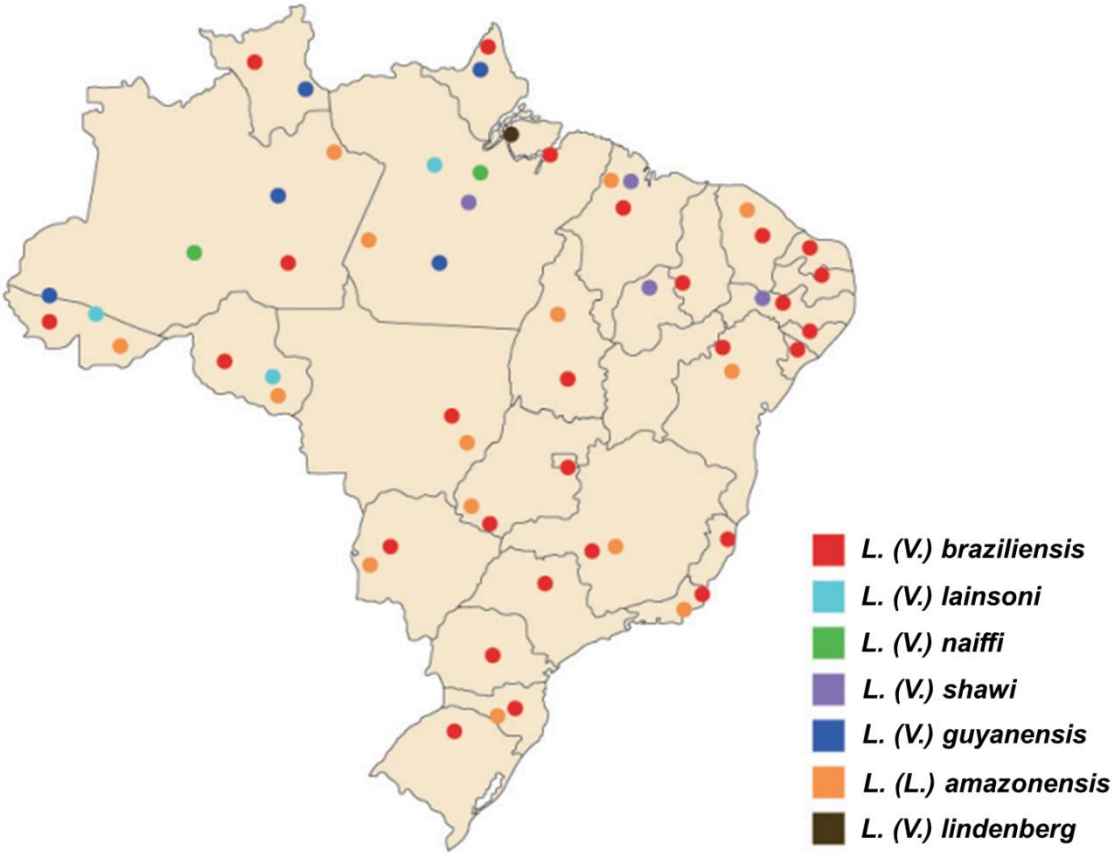

Figura 2. Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da LT no Brasil. Observar que *L. (V.) braziliensis* (representada por círculo vermelho) é a espécie prevalente no Brasil, seguido por *L. (L.) amazonensis* (representada por círculo laranja). Extraído de Manual de Vigilância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

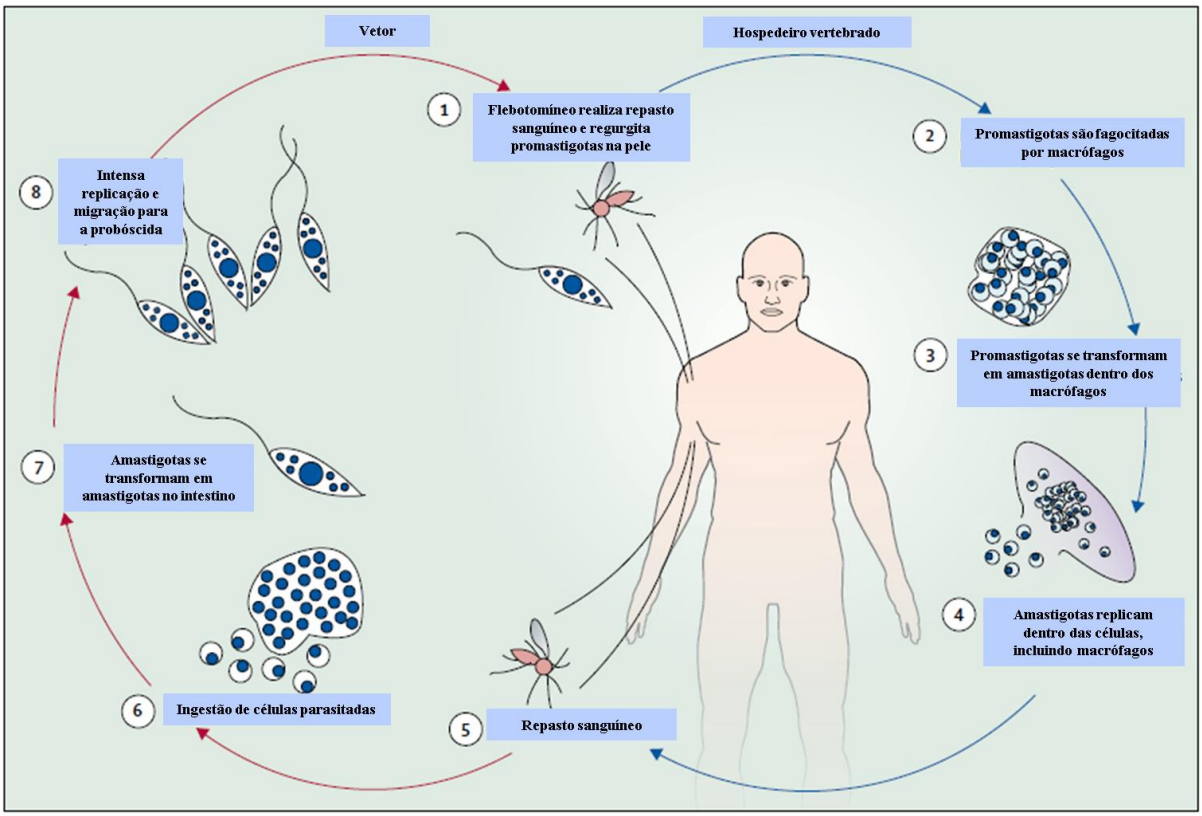

Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro vertebrado pelo inseto vetor e internalizadas em fagócitos. Nestas células, os parasitos assumem a forma amastigota que se multiplica. Com a replicação do parasito, a célula rompe e libera as formas amastigotas 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.

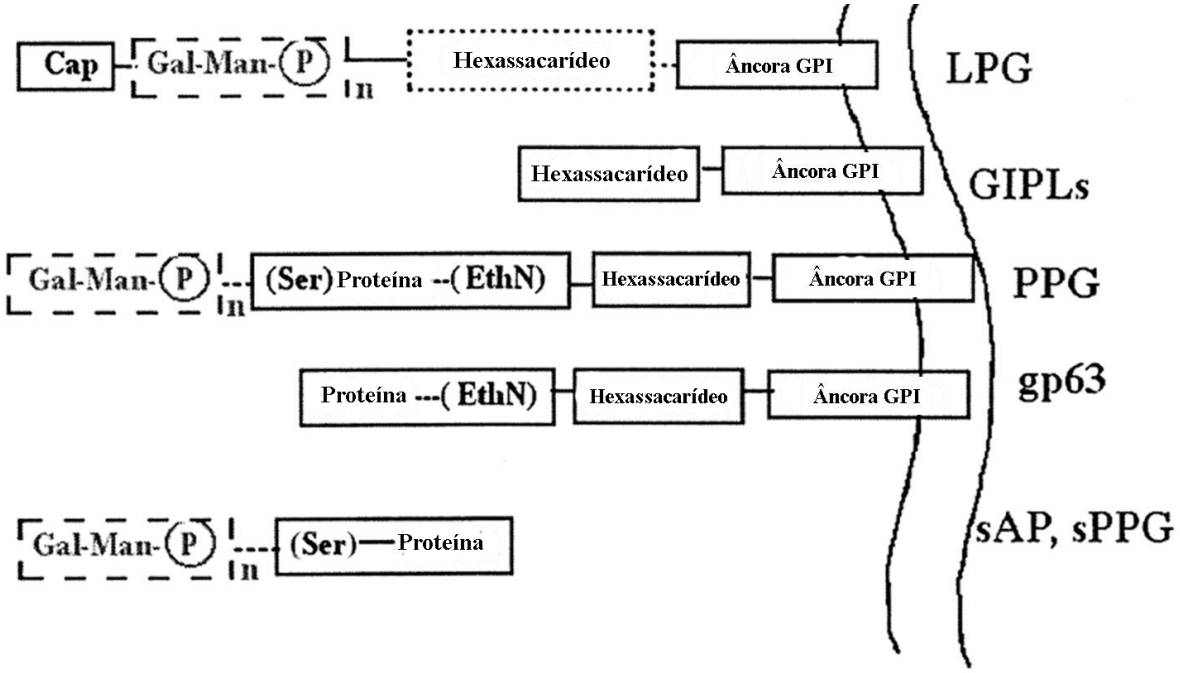

Figura 4. Representação dos principais glicoconjugados presentes na superfície celular promastigotas de espécies de *Leishmania*. O domínio de hexassacarídeos é comum aos glicoconjugados acorados à membrana. Notar que alguns glicoconjugados estão ancorados na membrana através da âncora lipídica de GPI. 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*.

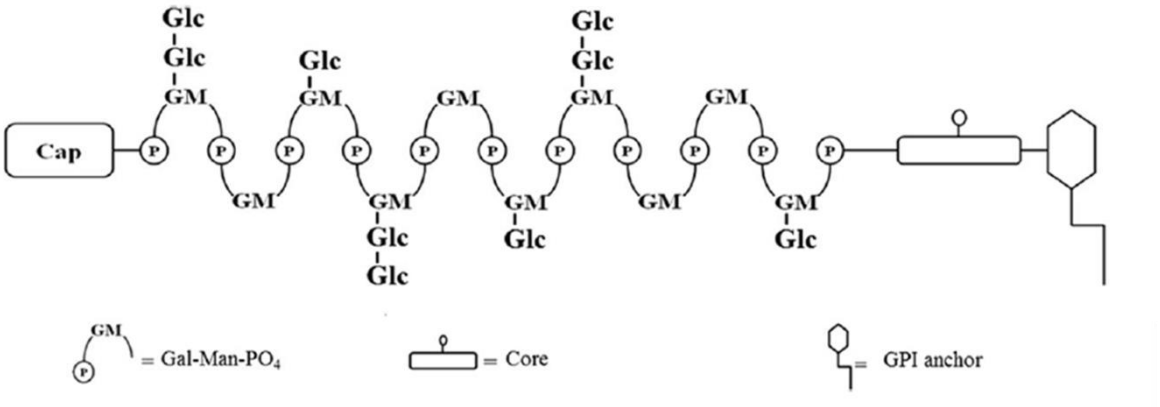

Figura 5. Representação esquemática do LPG de *L. (L.) amazonensis* cepa PH8. As unidades repetitivas contêm o dissacarídeo fosfatado Gal(β1,4)Man(α1)-PO_4 como estrutura principal. O LPG desta cepa contém substituições nas cadeias laterais de um ou dois resíduos de β-glicose. Os locais precisos das 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).

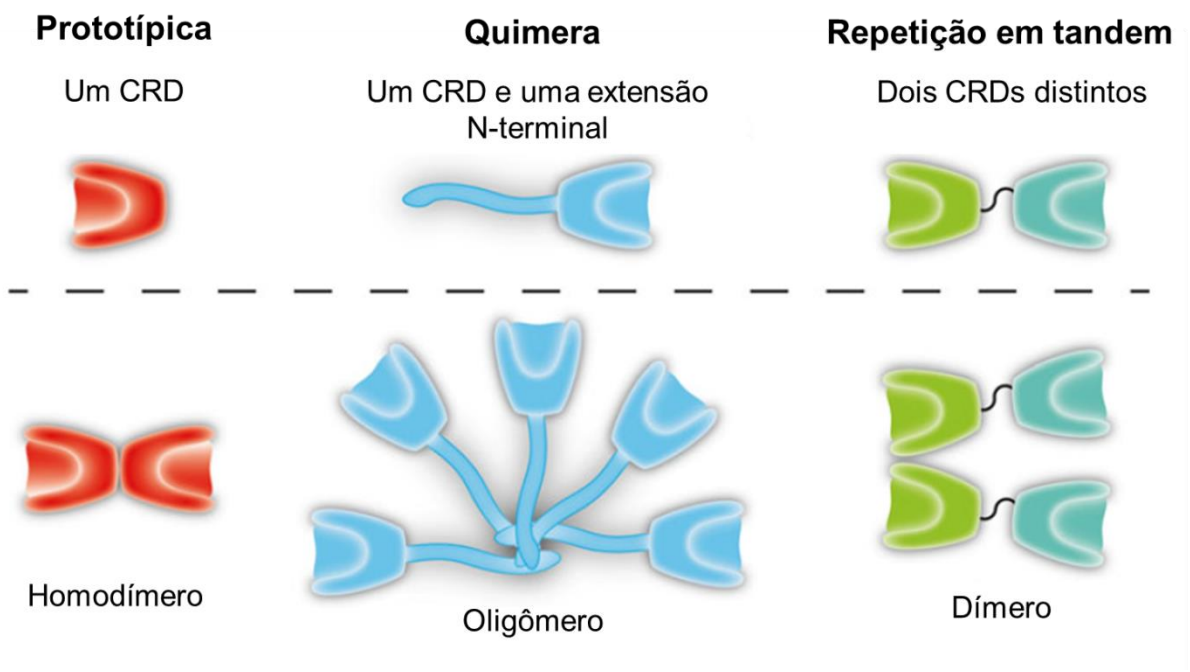

Figura 6. Representação esquemática da classificação das galectinas. Galectinas são proteínas ligadoras de β-galactosídeos e são classificadas em três grupos distintos de acordo com a sua estrutura quaternária: prototípica, quimérica e repetição em tandem. Prototípica: Gal-1, Gal-2, Gal-7, Gal-10, Gal-13 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*.

DESTAQUES

3. 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

4. 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.

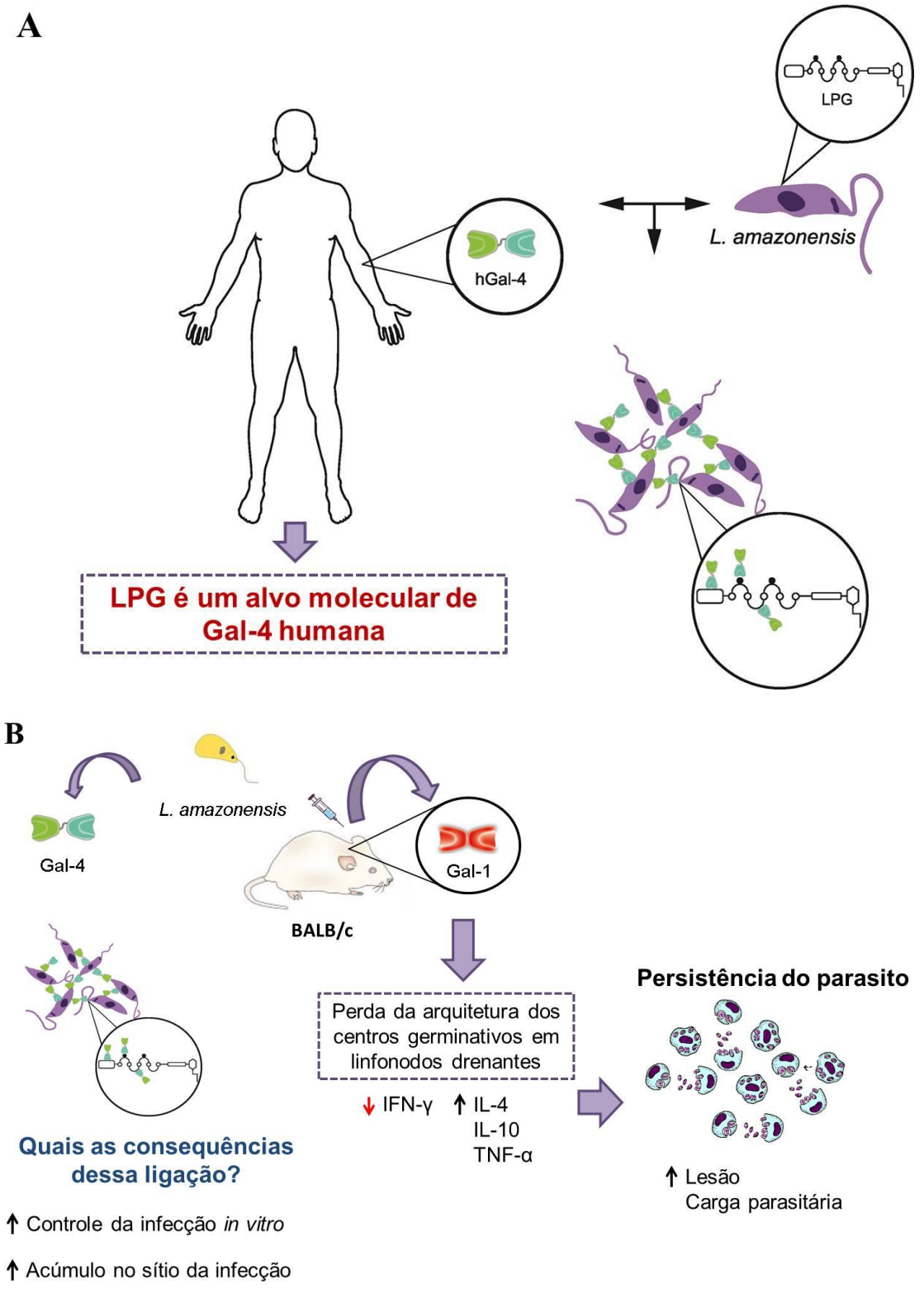

Figura 37. Esquema representativo da participação de Gal-1 e de Gal-4 no desenvolvimento da infecção experimental por *L. (L.) amazoensis*.

Referências

5. 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.