

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Fernanda de Lima Tana

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA GALECTINA-3 NA INFECÇÃO PELA BACTÉRIA
INTRACELULAR *Brucella abortus***

Belo Horizonte
2021

Fernanda de Lima Tana

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA GALECTINA 3 NA INFECÇÃO PELA BACTÉRIA
INTRACELULAR *Brucella abortus***

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

Co-orientadora: Dra Erika Sousa Guimarães

Belo Horizonte
2021

043

Tana, Fernanda de Lima.

Avaliação do papel da galectina-3 na infecção pela bactéria intracelular *Brucella abortus* [manuscrito] / Fernanda de Lima Tana. – 2021.

104 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira. Co-orientadora: Dra Erika Sousa Guimarães.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Brucella abortus*. 3. Galectina 3. 4. Interferon Tipo I. 5. Inflamassomos. 6. Vacúolos. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Guimarães, Erika Sousa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE FERNANDA DE LIMA TANA. Aos vinte e três dias do mês de novembro de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Avaliação do papel da Galectina-3 na infecção pela bactéria intracelular *Brucella abortus*”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Leonardo Augusto de Almeida (Universidade Federal de Alfenas), aprovada; Dr. Gilson Costa Macedo (Universidade Federal de Juiz de Fora), aprovada; Dr. Luís Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Érika Sousa Guimarães - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ (X) APROVADA
☐ () REPROVADA

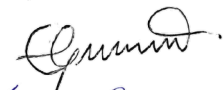
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de novembro de 2021.

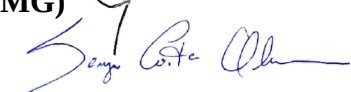
Dr. Leonardo Augusto de Almeida (Universidade Federal de Alfenas) 

Dr. Gilson Costa Macedo (Universidade Federal de Juiz de Fora) 

Dr. Luís Henrique Franco (UFMG) 

Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG) 

Dra. Érika Sousa Guimarães - Coorientadora (UFMG) 

Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG) 

*Dedico este trabalho ao Santo Padre Victor,
grande intercessor! Sem todas as bênçãos que Ele
me concedeu durante esses 4 anos, tudo seria mais
difícil.*

*(Com certeza, Ele aprendeu a técnica de Western
Blotting!)*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e saúde para concluir essa etapa. Por todas as bênçãos que me concedeu e por me dar resiliência para esperar o melhor apesar das adversidades.

Ao meu orientador Sergio Costa por ter me dado a grande oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Agradeço pela orientação, pelos ensinamentos, estrutura disponibilizada para realização do projeto, pela paciência, oportunidade de crescimento e chance que me concedeu ao me acolher como sua orientada.

Agradeço a minha co-orientadora Erika Sousa Guimarães pela orientação, paciência e profissionalismo em todos os momentos.

A Sandra e a Ilma, por toda a dedicação pelo seu trabalho, fazendo a diferença na execução de todos os projetos realizados no LIDI, não deixando faltar nada para que os experimentos fossem realizados da melhor maneira possível, inclusive nessa fase extremamente difícil e nova de isolamento social. Agradeço a amizade, carinho e cuidado!

A Daiane por toda a amizade e grande ajuda! Obrigada por me ensinar técnicas, por dividir fluxos e bancadas comigo. Obrigada pelos ensinamentos teóricos e práticos e pelas discussões dos resultados de experimentos.

A Priscila por ter me acolhido no LIDI durante o início dessa jornada. Obrigada por ter me ajudado a enfrentar momentos de dificuldades e me lembrar que eu era capaz de passar pelos desafios do doutorado! Obrigada também por todo o exemplo e conhecimento que me transmitiu!

Ao Marco Tulio e ao Fábio Marinho pela ajuda com os experimentos, pela disponibilidade, paciência e colaboração.

Aos grandes amigos do Grupo Zeta do LIDI, em especial à Claudinha, Rayane, Brunão e Ivan pelos ótimos momentos de descontração. Obrigada pelos melhores happy hours, pelos carnavais que passamos juntos em BH e pelo convívio diário no laboratório e no ICB, fazendo a rotina ser mais leve.

Ao Fábio Mambelli, meu querido amigo Mambe Shark! Foi uma grande sorte e prazer poder trabalhar com você novamente! Tenho orgulho do profissional que se tornou! Obrigada por ser meu melhor amigo desde o primeiro dia da graduação, lá em 2011! Obrigada a Nina

por toda a ajuda, conselhos e conversas! Enfim, obrigada á todos os Lidianos pelo convívio e troca de experiências.

Aos meus amigos Felipe Rocha, Luiz Pedro e Dani Dani! Que alegria ter encontrado vocês na continuação dessa jornada! Grande e sincera amizade que construímos dia a dia!!

Aos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia por todo o conhecimento transmitido. Ao Orlando e ao Alexandre por todo o suporte desde a matrícula.

Agradeço aos membros da banca de qualificação por todas as considerações para que chegássemos até aqui. Agradeço aos professores membros da banca de tese, por serem acessíveis desde o primeiro momento e por suas disponibilidades e contribuições valiosas para este trabalho.

Á UFMG, ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, às agências de fomento que contribuem para a concretização do nosso trabalho, pela oportunidade e pelo meu crescimento acadêmico.

Aos meus pais Cláudio, Solange e ao meu irmão Filipe. Obrigada por sonharem comigo, pelo apoio, carinho, parceria e principalmente, paciência. Vocês são meus maiores exemplos! Obrigada a toda a minha família, meus queridos primos, e, em especial ao Vini e ao Binho, mesmo que a distância, estavam presentes em momentos importantes durante o meu doutorado. Amo vocês!

Aos meus amigos da disciplina de Bases: Tamara, Letícia, Thais, Christina e Sílvia. Obrigada por tornarem BH um lugar especial! Obrigada a todos!!

RESUMO

Brucella abortus é uma bactéria Gram-negativa, patógeno intracelular facultativo, que causa febre ondulante e artrite em humanos e infertilidade em animais, resultando em sérias perdas econômicas. A patogênese ocasionada pela infecção por *Brucella* está associada a sua eficiência em replicar em células dendríticas e macrófagos do hospedeiro. No interior dos fagócitos, essa bactéria reside em vacúolos denominados “Vacúolos contendo *Brucella*” (BCV). A resposta imune contra esse patógeno envolve a ativação de uma série de receptores de reconhecimento de patógenos e de moléculas efetoras importantes para o controle da infecção. As galectinas representam um grupo de proteínas capazes de se ligar a patógenos e modular a resposta imune. Nesse contexto, diferentes papéis têm sido atribuídos a Galectina-3 durante a resposta imune contra patógenos, como por exemplo, mediar funções bactericidas e regular eventos inflamatórios, como a produção de citocinas. Estimulados pelos papéis da Gal-3 já descritos durante infecções, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da Gal-3 durante a infecção por *B. abortus*. Nesse trabalho, demonstramos que a *B. abortus* induz a expressão de Gal-3. Além disso, mostramos que a Gal-3 é dispensável para o rompimento de vacúolos contendo *Brucella*, para ativação de inflamassoma e piroptose. Por outro lado, observamos que a Gal-3 induzida por *Brucella* é crucial para a indução de moléculas associadas à via de sinalização de IFN tipo I, como IFN- β , CXCL10 e GBPs. Macrófagos Gal-3 KO mostraram números de bactérias reduzidos em comparação com células do tipo selvagem, sugerindo que Gal-3 facilita a replicação bacteriana *in vitro*. Também demonstramos que o priming de células Gal-3 KO com IFN- β recombinante favoreceu a sobrevivência de *B. abortus* em macrófagos. Em adição, avaliamos a importância de Galectina-3 na infecção *in vivo* e observamos que camundongos Gal-3 KO são mais resistentes à infecção por *B. abortus* e esses animais apresentaram produção elevada de citocinas pró-inflamatórias quando comparados aos camundongos controle. Por fim, observamos um aumento do recrutamento de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos em baços de camundongos Gal-3 KO em comparação com animais do tipo selvagem. Coletivamente, estes dados sugerem que a Gal-3 induzida por *Brucella* é prejudicial ao hospedeiro e esta molécula está relacionada a inibição do recrutamento e ativação de células imunes, o que promove a disseminação de *B. abortus* e agrava a infecção.

Palavras-chave: *Brucella abortus*, Galectina-3, proteínas ligadora de guanilato, inflamassoma, IFN do tipo I, vacúolo

ABSTRACT

Brucella abortus is a Gram-negative bacterium, facultative intracellular pathogen, which causes undulant fever and arthritis in humans and infertility in animals, resulting in serious economic losses. *Brucella* pathogenesis is associated with the bacteria replication efficiency in the host dendritic cells and macrophages. *B. abortus* lives in vacuoles termed *Brucella* containing vacuoles (BCVs) localized inside phagocytes. Innate immune response against *B. abortus* involves the activation of several pathogen recognition receptors in the antigen presenting cells (APCs). Galectins are a group of proteins characterized by the ability to bind pathogens and modulate the immune response. Recently, different roles have been related to Gal-3 in the immune response, such as the direct interaction with pathogens surface glycans and regulation of inflammatory events, like cytokines production. However, the role of Gal-3 during *B. abortus* infection has not yet been investigated. The aim of this study was to evaluate the role of Gal-3 during *B. abortus* infection. Our findings indicate that Gal-3 is dispensable for *Brucella*-containing vacuoles disruption, inflammasome activation and pyroptosis. On the other hand, we observed that *Brucella*-induced Gal-3 expression is crucial for induction of molecules associated to type I IFN signaling pathway, such as Interferon beta (IFN- β), C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) and guanylate-binding proteins (GBPs). Gal-3 KO macrophages showed reduced bacterial numbers compared to wild-type cells, suggesting that Gal-3 facilitates bacterial replication in vitro. Moreover, priming Gal-3 KO cells with IFN- β favored *B. abortus* survival in macrophages. Additionally, we also observed that Gal-3 KO mice are more resistant to *B. abortus* infection and these animals showed elevated production of proinflammatory cytokines when compared to control mice. Finally, we observed an increased recruitment of macrophages, dendritic cells and neutrophils in spleens of Gal-3 KO mice compared to wild-type animals. In conclusion, this study demonstrated that *Brucella*-induced Gal-3 is detrimental to host and this molecule is implicated in inhibition of recruitment and activation of immune cells, which promotes *B. abortus* spread and aggravates the infection.

Keywords: *Brucella abortus*, Galectin-3, guanylate-binding protein, inflammasome, type I IFN, vacuole

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do LPS de <i>Brucella</i>	18
Figura 2 - <i>Heat map</i> de casos relatados de Brucelose animal no mundo (<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> e <i>B. suis</i>).	19
Figura 3 - Formas de transmissão da Brucelose	21
Figura 4 - Modelo de interação entre <i>Brucella spp.</i> e células hospedeiras.....	25
Figura 5 - Ativação do inflamassoma não-canônico levando a piroptose e restrição de infecções bacterianas	31
Figura 6 - Estrutura das Galectinas e interações Galectinas–glicanos (<i>Lattices</i>)	37
Figura 7 - Atividade de ligação e papéis biológicos dos tipos de Galectinas.....	38
Figura 8 - A infecção por <i>B. abortus</i> induz a expressão de Galectina-3	58
Figura 9 - A Galectina-3 é necessária para as respostas de IFN do tipo I induzidas em resposta a <i>B. abortus</i>	60
Figura 10 - A Galectina-3 influencia a expressão das GBPs mas não é necessária para o rompimento do vacúolo de <i>B. abortus</i>	63
Figura 11 - A Galectina-3 não influencia a ativação do inflamassoma durante a infecção por <i>B. abortus</i>	65
Figura 12 – A Galectina-3 é necessária para a replicação eficiente de <i>B. abortus</i> em macrófagos.....	67
Figura 13 - A deficiência de Gal-3 aumenta a proteção do hospedeiro contra a infecção por <i>B. abortus</i>	69
Figura 14 - A Galectina-3 regula o recrutamento de células imunes inatas.	71
Figura 15 - Modelo esquemático proposto para o papel da Galectina-3 em resposta à infecção por <i>B. abortus in vitro</i> e <i>in vivo</i>	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR em tempo real	54
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM2: *Absent in melanoma 2*

ANOVA: Análise de variância

APCs: células apresentadoras de antígenos

ASC: *Apoptosis-Associated Speck-like protein containing a caspase recruitment domain*

ATP: Adenosina trifosfato

BB: Brucella Broth

BCV: Vacúolo contendo *Brucella*

BMDM: Macrófago derivado de medula óssea

BSA: Albumina sérica bovina

CARD: Caspase recruitment domain

CFU: Unidade Formadora de Colônia

CXCL10: *C-X-C motif chemokine ligand 10*

DAMP: Padrão Molecular Associado ao Dano

DMEM: Meio *Dulbecco's Modified Eagle's*

DNA: Ácido Desoxiribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiamina tetracético

ELISA: Ensaio Imunoenzimático de Adsorção

Gal-3: Galectina-3

GBP: Proteína ligadora de guanilato

i.p: intraperitoneal

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IRE1 α : *inositol-requiring enzyme 1 α*

IRF: Fator regulatório de interferon

IRGB10: *Immunity-related GTPase family member b10*

K⁺: potássio

LAMP1: *Lysosomal Associated Membrane Protein 1*

LCCM: Meio Condicionado de células L929

LDH: lactato desidrogenase

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

MFI: intensidade média de fluorescência

min: minutos

ml: mililitros

MOI: Multiplicidade de infecção

M-PER: *Mammalian Protein Extraction Reagent* **MPO:** mieloperoxidase

MyD88: *Myeloid differentiation primary response protein (88)*

NF-κB: Nuclear factor kappa B

NI: Não Infectado

NLR: *Nod-Like Receptor*

NLRP: *NLR family, Pyrin domain containing*

NO: óxido nítrico

NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMP: Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PBS: Salina Tamponada com Fosfato

PCV: vacúolo contendo patógeno

PRR: Receptor de Reconhecimento de Padrão

PV: vacúolo de patógeno

RE: retículo endoplasmático

rpm: Rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SBF: Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

STING: Proteína estimuladora de genes de interferons

T4SS: sistema de secreção do tipo IV

TLR: Receptor do Tipo Toll

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

U: Unidades

UPR: Resposta a proteínas mal enoveladas

WT: Selvagem (*Wild-type*)

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1 – Descrições iniciais do gênero <i>Brucella spp.</i>	16
1.2 –O gênero <i>Brucella spp.</i>	16
1.3 – Brucelose	18
1.4 - Patogênese	22
1.5- Resposta imune à <i>Brucella spp</i>	26
1.5.1 Resposta imune inata	27
1.5.2 – Sinalização de interferon tipo I e seu papel durante infecções bacterianas	32
1.5.3 – Resposta imune adaptativa à <i>Brucella spp</i>	34
1.6 – Galectinas.....	35
1.7 – Galectina 3	40
2- JUSTIFICATIVA.....	44
3- OBJETIVOS	45
3.1 – Objetivo geral	45
3.2 – Objetivos específicos	45
4- METODOLOGIA	46
4.1 – Bactérias.....	46
4.2 – Animais experimentais	46
4.3 – Cultura e estímulo de macrófagos derivados da medula óssea.....	47
4.4 – Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas	47
4.5 – Ensaio de liberação de lactato desidrogenase.....	48
4.6 – Ensaio de produção de óxido nítrico.....	48
4.7 – Preparo do inóculo de <i>Brucella abortus</i> e determinação da replicação bacteriana	49
4.7.1 – Determinação do número de unidades formadoras de colônias.....	49
4.7.2 – Análise da produção de citocinas por esplenócitos.....	50
4.8 – Ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO)	50
4.9 – Western blot	51

4.10 – Microscopia confocal.....	52
4.11 – Microscopia eletrônica de transmissão	52
4.12 – Análise da expressão diferencial de genes por PCR em tempo real	53
4.12.1 – Extração de RNA total e síntese de cDNA	54
4.12.2 – PCR em tempo real	54
4.13 – Análise de citometria de fluxo	55
4.14 – Análise estatística	56
5- RESULTADOS.....	57
5.1 – A infecção por <i>Brucella abortus</i> induz a expressão de Galectina-3.....	57
5.2 - A Galectina-3 é requerida para as respostas de IFN do tipo I induzidas em resposta a <i>B. abortus</i>	59
5.3 – A Galectina-3 influencia a expressão das GBPs mas não é necessária para o rompimento do vacúolo de <i>B. abortus</i> BMDMs.....	61
5.4 – A Galectina-3 não influencia a ativação do inflamassoma durante a infecção por <i>B. abortus</i>	64
5.5 – A Galectina-3 é necessária para a replicação eficiente de <i>B. abortus</i> em macrófagos	66
5.6 – A deficiência de Gal-3 aumenta a proteção do hospedeiro contra a infecção por <i>B. abortus</i>	67
5.7 – A Galectina-3 regula o recrutamento de células imunes inatas	70
6- DISCUSSÃO	72
7- CONCLUSÃO	78
8- REFERÊNCIAS	79
9- ANEXO	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Descrições iniciais do gênero *Brucella* spp.

A brucelose compreende uma doença antiga e lesões típicas desta doença foram detectadas em cadáveres de fugitivos da erupção vulcânica na Pompéia. Além disso, testes moleculares demonstraram a presença de DNA de *B. melitensis* em um esqueleto de 700 anos da Itália medieval. (Bruce, 1887; Bang 1897; Hull, Schumaker; 2018). Predominante na região do Mediterrâneo, a brucelose, também chamada de febre de Malta, atingiu marinheiros da Marinha Real Britânica cujo sintoma principal era uma fraqueza crônica que podia se complicar em um reumatismo (Christopher et al., 2010).

Historicamente, no ano de 1859, foi descrito por Martson uma doença infecciosa com sintomas de fraqueza, (Vassallo, 1992), porém, as primeiras descrições do agente causador da Brucelose ocorreram por volta de 1887, quando Sir David Bruce, cirurgião do exército britânico, isolou um cocobacilo, nomeado por ele de “*Micrococcus melitensis*” a partir do tecido esplênico de um homem que havia morrido em decorrência de febre de Malta (Bruce, 1887; Cutler et al., 2005). Posteriormente, Bernard Bang isolou de um aborto bovino, um cocobacilo denominado de *Bacillus abortus* (Bang 1897; Hull, Schumaker; 2018). Em homenagem a Sir Bruce, a nomenclatura do gênero foi padronizada para *Brucella*.

1.2 – O gênero *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella* spp. abrangem bactérias gram-negativas, que apresentam formato de pequenos bastões ou coco-bacilos, são intracelulares facultativas, imóveis, que não esporulam e não encapsulam. Essas bactérias podem infectar uma ampla gama de espécies de mamíferos, incluindo humanos, além de alguns anfíbios (Corbel, 1997; Percin, 2013).

Filogeneticamente, a *Brucella* é classificada dentro das subdivisões $\alpha 2$ -proteobacteria, ordem Rhizobiales, família Brucellaceae e gênero *Brucella* (Ugalde, 1999; Christopher et al., 2010). São conhecidas 10 espécies de *Brucella* que exibem diferenças de

patogenicidade e preferência por hospedeiros distintos. Dentre elas estão *Brucella melitensis*, isolada de caprinos; *Brucella abortus*, isolada de bovinos; *Brucella suis*, isolada de suínos; *Brucella canis*, isolada de caninos; *Brucella ovis*, isolada de ovinos e *Brucella neotomae* que foi isolada de um tipo de rato do deserto Norte americano. A base para a preferência por hospedeiros permanece uma questão em aberto, embora possa estar relacionado com pseudogenes que influenciam na adaptação para cada hospedeiro (Figueiredo et al., 2015).

As espécies *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* são patogênicas para os seres humanos causando uma doença conhecida como brucelose, sendo a *Brucella melitensis* a espécie com maior severidade de infecção, e a *Brucella abortus* a espécie mais difundida no mundo (Corbel, 1997; Cutler et al., 2005), tornando assim a brucelose, uma zoonose de grande importância mundial. No entanto, com a possibilidade de identificação de novas cepas de *Brucelas*, o quadro completo da saúde humana e animal ainda não é totalmente elucidado (Hull, Schumaker; 2018).

O genoma da *Brucella* é composto por dois cromossomos circulares, I e II, de aproximadamente 2,1 e 1,2 megapares de bases (Mb) respectivamente. Os dois cromossomos diferem em alguns aspectos e a maioria dos genes essenciais estão localizados no cromossomo I. Ao passo que o genoma dessa bactéria é conhecido, estudos significativos foram realizados sobre os mecanismos efetores e de virulência da espécie (Halling et al., 2005). O lipopolissacarídeo (LPS) representa um dos principais fatores de virulência da *Brucella*, e sua estrutura difere do LPS clássico de enterobactérias como, por exemplo, *Escherichia coli*. O LPS de *Brucella* é composto por três domínios: (i) o lipídeo A, (ii) o oligossacarídeo central, (iii) e a cadeia O (Figura 1) (Cardoso et al., 2006). De acordo com a forma que a cadeia O é expressa, as bactérias podem ser classificadas em lisas e rugosas, sendo que as bactérias lisas apresentam a cadeia O completa e correspondem cepas virulentas e as bactérias rugosas, que exibem a cadeia O em uma forma reduzida ou ausente, correspondem às cepas avirulentas. Dessa forma, devido a sua menor virulência, as cepas rugosas de *Brucella* apresentam um alto poder vacinal (Caroff et al., 2002; Erridge et al., 2002). As formas rugosas das cepas surgem espontaneamente a partir das cepas lisas em culturas (Smith, Ficht, 1990). O LPS não canônico de cepas da *Brucella* lisa é considerado um mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro. A presença de moléculas alongadas de ácidos graxos na porção lipídica A, diminuem as propriedades endotóxicas do

LPS e modulam a resposta imune, uma vez que essas cadeias longas não são eficientemente reconhecidas por TLR4, tornando-se um fraco agonista desse receptor de reconhecimento (Figueiredo et al., 2015).

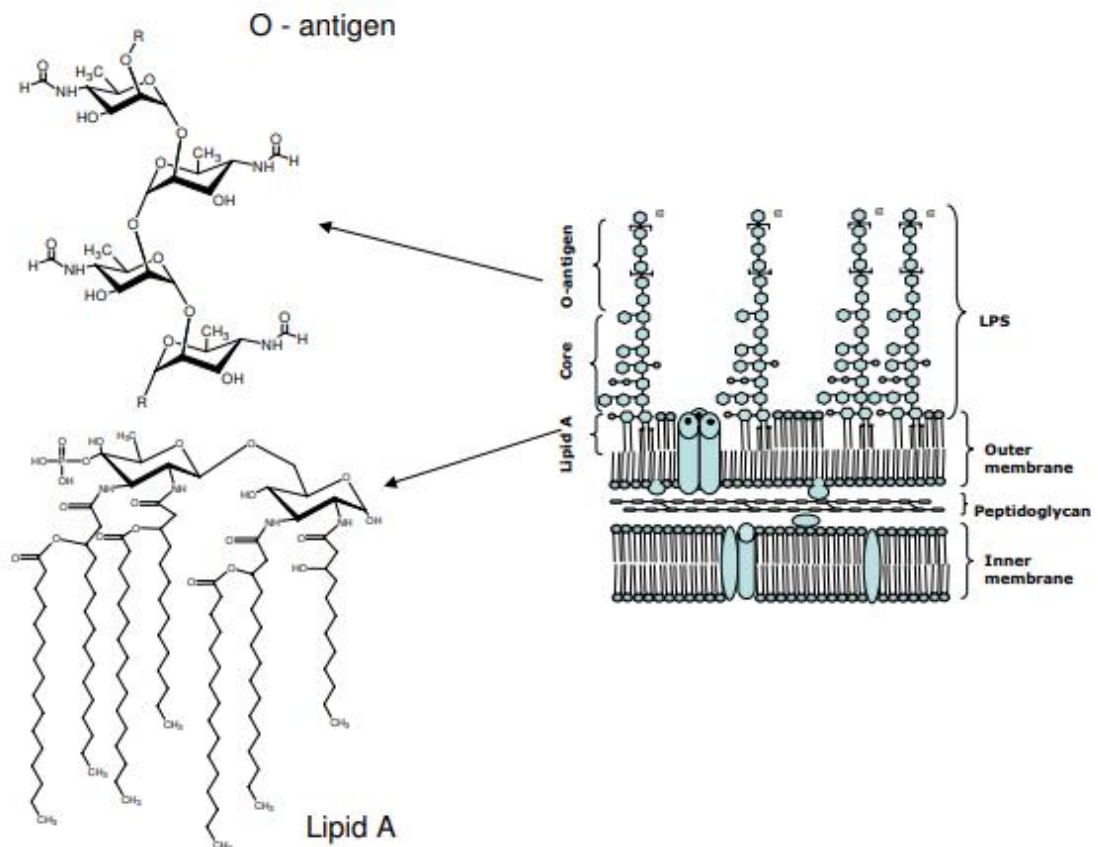


Figura 1: Representação esquemática do LPS de *Brucella*

Fonte: Cardoso et al., 2006.

1.3 A Brucelose

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e a Organização Mundial da Saúde (OMS), a brucelose é a zoonose mais difundida no mundo e ainda assim, está entre as sete doenças mais negligenciadas. Existem aproximadamente 500.000 casos de incidentes relatados de brucelose humana anualmente; entretanto, a incidência real é estimada em 5.000.000 a 12.500.000 casos por ano em todo o mundo (Poester et al., 2002; Hull, Schumaker; 2018).

Dentre os países que relatam estatísticas à OMS, aqueles que apresentam maior incidência de casos são México, China, Síria, Mongólia e Iraque. Na figura 2, podemos observar através do *Heat map* o número de casos notificados de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* em animais em todo o mundo. Entretanto, é válido destacar que outros países também são conhecidos por serem endêmicos para a doença, porém podem não ser relatados devido a falta de vigilância, bem como à falta de notificação à OMS. (Pappas et al., 2006; Hull, Schumaker; 2018).

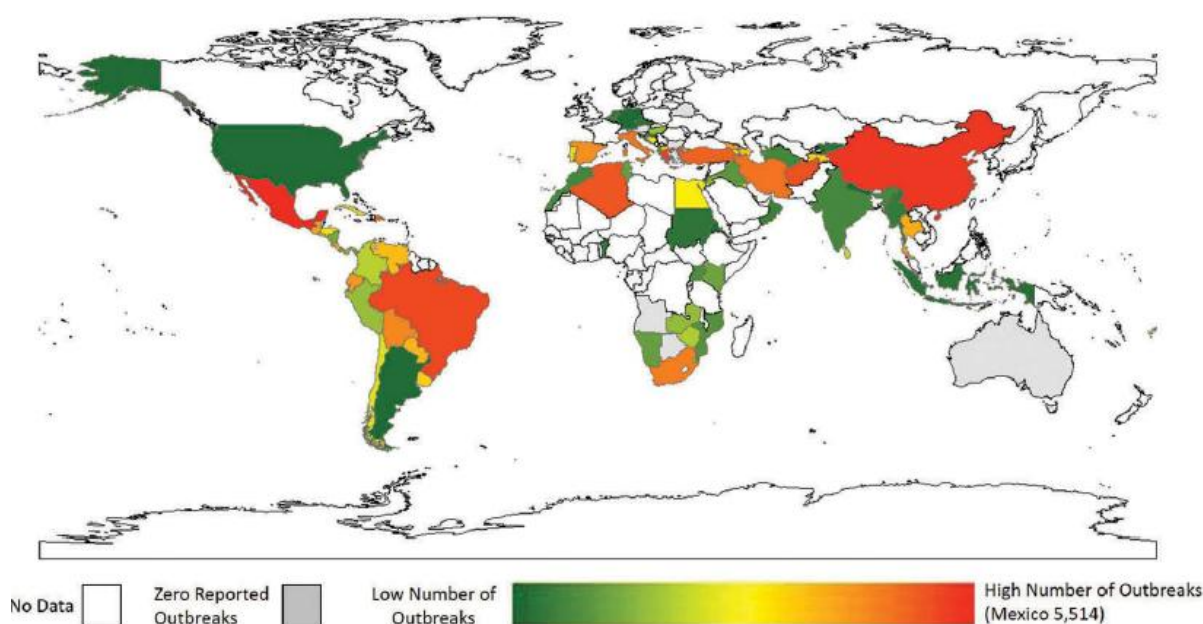


Figura 2: Heat map de casos relatados de Brucelose animal no mundo (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*).
Fonte: Hull, Schumaker; 2018

No Brasil, a brucelose foi detectada pela primeira vez em 1913 por Gonçalves Carneiro, que relatou um caso de brucelose humana (Garcia-Carrillo, 1987). Desde então, vários levantamentos epidemiológicos revelaram a presença da doença em animais domésticos em todo o país. A brucelose bovina ocasionada pela *Brucella abortus* é a infecção ocasionada pelo gênero *Brucella* mais prevalente no Brasil e no mundo, e pode ocasionar redução da produtividade em rebanhos, além de poder tornar a carne e o leite vulneráveis a barreiras sanitárias no mercado internacional, levando a um impacto econômico estimado em 32 milhões de dólares anualmente para a economia brasileira (Poester et al., 2002; Hull, Schumaker; 2018).

Nos hospedeiros animais, *Brucella spp* infecta órgãos e tecidos do trato reprodutivo, entre eles a placenta e as glândulas mamárias (Carvalho et al., 2010). A transmissão entre os hospedeiros animais pode ocorrer através da liberação da placenta altamente colonizada, as quais podem ser ingeridas por outros animais infectando-os. Alternativamente, a transmissão dentro dos hospedeiros naturais pode ocorrer através do leite ou via sêmen ou secreções genitais durante o acasalamento. (Xavier et al., 2010). A brucelose é transmitida de animais para os seres humanos através da ingestão de produtos alimentícios como leite e seus derivados infectados, contato direto com um animal infectado, por inalação de aerossóis contendo o patógeno ou contato com a mucosa ou feridas. Entretanto, a disseminação entre humanos não acontece na Brucelose (Figura 3). (Poester et al., 2002; Christopher et al., 2010; Atluri et al., 2011). A infecção por *Brucella* também é frequentemente adquirida através de exposição ocupacional por profissionais veterinários e laboratoristas que trabalham diretamente com o patógeno e isso é atribuído à baixa dose infecciosa, estimada entre 10 a 100 células bacterianas por aerossol ou via subcutânea (Mense et al., 2004; Weinstein, Singh; 2009).

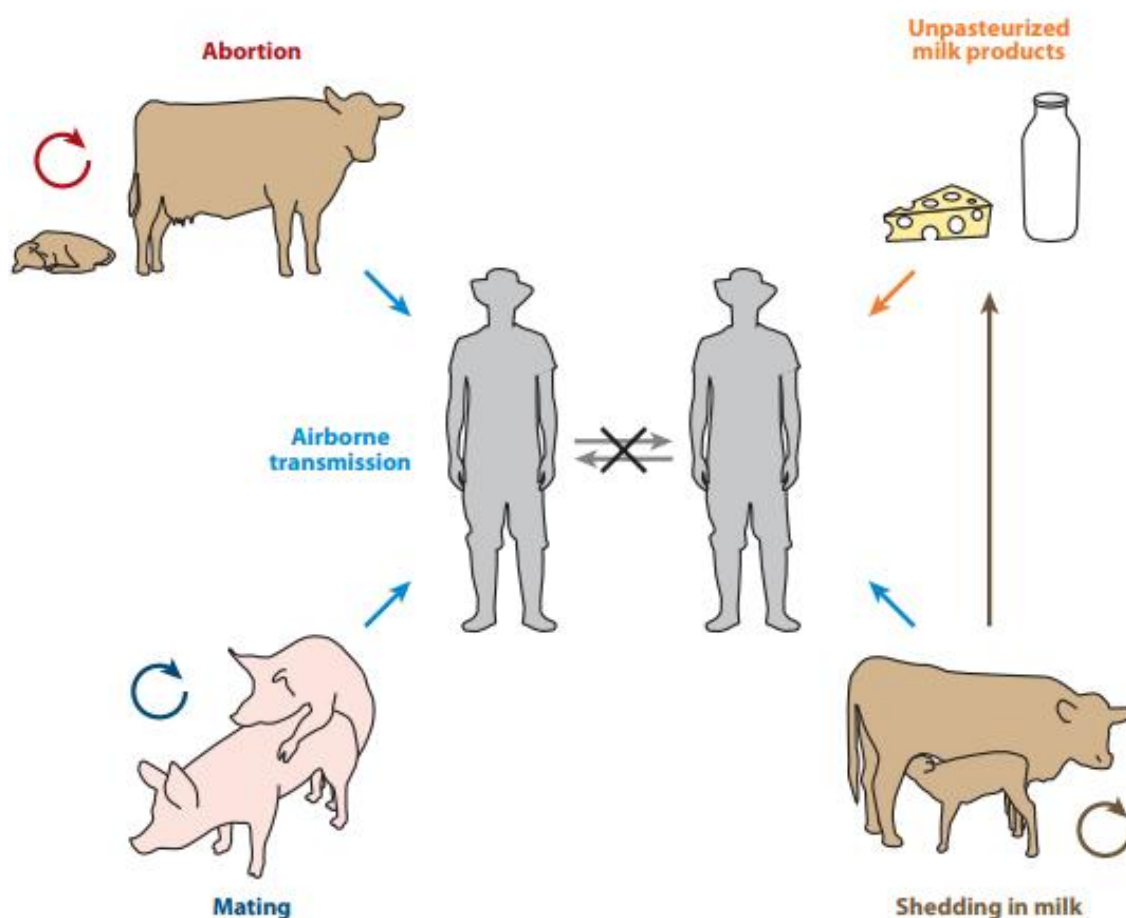


Figura 3: Formas de transmissão da Brucelose.

Fonte: Atluri et al., 2011.

Os sintomas clínicos da brucelose diferem significativamente entre humanos e animais. Em geral, na brucelose bovina, caprina e suína ocasionadas pelas *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* respectivamente, os animais podem apresentar mastite, prole frágil, febre, infertilidade e aborto espontâneo, sendo este último sintoma, o mais característico da doença em animais. A mastite também representa uma característica importante da brucelose animal e as glândulas mamárias se transformam em nichos replicativos para as bactérias, possibilitando sua evasão ao sistema imune do hospedeiro. A *Brucella* é eliminada no leite dos animais infectados em lactação e esta representa uma via de transmissão secundária para bezerros não infectados além de ser a via de transmissão zoonótica mais importante para os seres humanos (Pappas et al., 2006; Godfroid, et al., 2013). Portanto, o principal fator de risco para a

brucelose humana está relacionado com o consumo de leite e seus derivados não pasteurizados (Sofian et al., 2008; Hull, Schumaker; 2018).

Após a *Brucella* entrar em contato com os hospedeiros humanos, ocorre um período de incubação de aproximadamente 10 a 21 dias. Após esse período, ocorrem diversas manifestações clínicas. Em humanos, a brucelose raramente é fatal, representando menos de 1% dos casos clínicos (Geng et al., 2016). Os casos tipicamente se apresentam com debilitação e incapacidade severa podendo causar febre ondulante, artrite, endocardite, osteomielite e complicações neurológicas, o que dificulta o diagnóstico da doença.

Atualmente, não há nenhuma vacina desenvolvida e aprovada para o uso em humanos e o tratamento para a brucelose é realizado através de terapia antimicrobiana, levando em conta a gravidade dos sintomas desenvolvidos durante a infecção (Roth et al., 2003; Geng et al., 2016; Hull, Schumaker; 2018). No entanto, em populações animais, três vacinas principais são utilizadas, sendo elas, RB51 e S19 para casos de *B. abortus* e a Rev1 para casos de *B. melitensis*. Apesar das vacinas não impedirem a infecção dos animais, elas diminuem a probabilidade de um evento de aborto, que por sua vez quebra o ciclo de transmissão e protege os animais restantes no rebanho (Stevens et al., 1994; Hull, Schumaker; 2018).

1.4 Patogênese e replicação de *B. abortus*

A patogênese ocasionada pela infecção pela *Brucella* está associada à sua capacidade de evasão de mecanismos de defesa e da sua eficiência em replicar nas células do hospedeiro, infectando primariamente células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas e macrófagos. Essas células representam um nicho de sobrevivência e replicação inicial além de contribuírem na disseminação sistêmica desse patógeno (Archambaud et al., 2010). Além da infecção de APCs, essas bactérias são capazes de infectar e de se replicar em uma ampla variedade de células de mamíferos, incluindo microglia, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais, podendo persistir em lesões granulomatosas e proliferar dentro de trofoblastos placentários de fêmeas grávidas (Martirosyan e Gorvel, 2013). Por se tratar de uma bactéria intracelular, a *Brucella* é capaz de limitar a exposição às respostas imunes extracelulares como anticorpos e o sistema complemento além de resistir e escapar dos

mecanismos de morte das células fagocíticas, interferindo no início das respostas imunes do hospedeiro (Martirosyan e Gorvel, 2013; Figueiredo et al., 2015).

Após a adesão à superfície das células da mucosa, a *Brucella* invade as células do hospedeiro através de um mecanismo dependente de “*lipid rafts*” que compreendem domínios da membrana plasmática que são compostos de colesterol e glicoesfingolipídeos. Esta interação se dá através do lipídeo A do lipopolissacarídeo de cepas lisas da bactéria (Zaas et al., 2005).

No interior dos fagócitos, este patógeno reside em vacúolos denominados “vacúolo contendo *Brucella*” (BCV), sendo capaz de modificar o tráfego intracelular, transformando o vacúolo em um compartimento replicativo, o brucelossomo (Foulongne et al., 2002). O microambiente dentro do BCV é caracterizado por uma quantidade de nutrientes limitada, porém a *Brucella* é capaz de se adaptar as condições de baixa de nutrientes através de uma redução significativa da expressão de alguns genes e da síntese de proteínas envolvidas no metabolismo anabólico (Foulongne et al., 2002; Figueiredo et al., 2015). Estudos do ciclo intracelular de *Brucella* demonstraram que este patógeno controla a conversão do seu compartimento intracelular. O BCV interage com diferentes componentes celulares do hospedeiro como, por exemplo, lisossomos, endossomos e retículo endoplasmático sofrendo diferentes modificações durante estas interações e, dessa forma, passando por estágios distintos denominados eBCV (endossomal), rBCV (replicativo) e aBCV (autofágico), (Figura 4) (Celli, 2015).

Em seguida à fagocitose por macrófagos ou a entrada em células não fagocíticas, a *Brucella* que reside no BCV interage com endossomos primários das células do hospedeiro, onde adquire marcadores endocíticos como Rab 5, seu efetor EEA1 e o receptor de transferrina (TfR). Esta interação inicial do eBCV com endossomos primários é seguida pela interação com endossomos secundários e lisossomos, sendo marcado pela presença de LAMP1 e Rab7 (Pizarro-Cerdá et al., 1998; Celli et al., 2015).

Apesar de não ter sido detectada interação do eBCV com a catepsina D lisossômica, sugerindo que a *Brucella* é capaz de evitar a fusão do eBCV com lisossomos como meio de sobrevivência intracelular (Starr et al., 2008), nesse estágio, ocorre acidificação de pH que é considerada um marcador de fusão lisossomal, indicando que os eBCVs de fato podem sofrer

fusão com lisossomos, embora não na extensão de formação de fagolisossomos bactericidas (Starr et al., 2008; Celli et al., 2015).

A rápida acidificação de pH, que apesar de levar à morte de algumas bactérias, é essencial para a ativação do sistema de secreção do tipo IV (T4SS), codificado pelo operon *virB*. (Starr et al., 2008; Celli 2015). De fato, a acidificação do eBCV constitui um sinal para a indução intracelular do principal determinante da virulência de *Brucella*, o T4SS, que transporta proteínas efetoras no interior da célula hospedeira. A ativação do T4SS é fundamental para o controle de direcionamento do tráfego intracelular e para o estabelecimento e biogênese do nicho replicativo da *Brucella*, o rBCV. A formação do rBCV ocorre pela fusão do eBCV maduro com cisternas do retículo endoplasmático (RE) (Celli, 2015; Commerci et al., 2001). O T4SS é primordial para permitir uma infecção persistente, pois é capaz de alterar a maturação do BCV e inibir sua fusão com o lisossomo, permitindo assim que as bactérias interajam com o retículo endoplasmático e se repliquem intracelularmente (Figueiredo et al., 2015). Já foi demonstrado através de deleção gênica, que a inativação do T4SS faz com que os mutantes bacterianos se tornem incapazes de interagir com os sítios de saída do retículo endoplasmático e, por isso, ficam aprisionadas no eBCV (Delrue et al., 2001; Celli 2015).

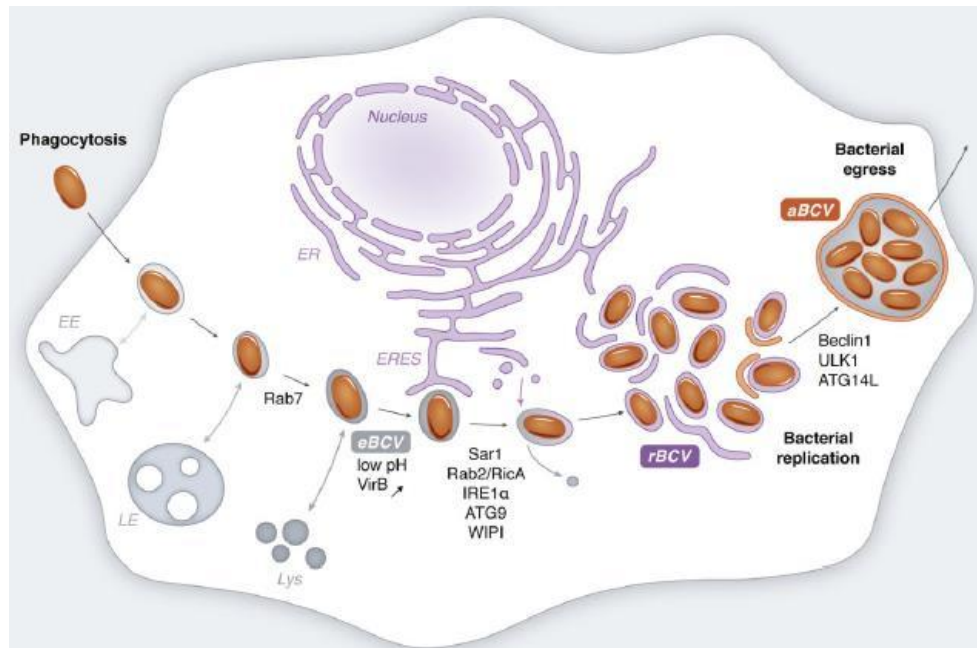


Figura 4: Modelo de tráfego intracelular de *Brucella* em células de mamíferos.
Fonte: Celli et al., 2015.

O rBCV possui marcadores de retículo endoplasmático como a calreticulina e a permanência e replicação da *Brucella* no retículo endoplasmático de células hospedeiras foi inicialmente descrita em estudos de placentas de caprinos e bovinos infectadas, indicando proliferação bacteriana dentro de cisternas do RE de trofoblastos (Starr et al., 2008). Trabalhos demonstraram a transição das bactérias de vacúolos endossômicos para o retículo endoplasmático através da imunocolocalização com marcadores para compartimentos intracelulares específicos (Pizarro-Cerdá et al., 1998; Celli et al., 2003). Independente do RE se tratar de um ambiente desprovido de funções bactericidas e ser rico em nutrientes, apenas algumas bactérias como *Brucella spp.*, *Legionella pneumophila* e *Chlamydia trachomatis*, são capazes de utilizar esse ambiente para sua sobrevivência intracelular e replicação (Horwitz, 1983; Derré et al., 2011; Celli 2015).

Além disso, tem sido proposto o envolvimento da autofagia na biogênese do rBCV (Celli et al., 2015). Um trabalho identificou que o IRE1 α , um sensor transmembrana envolvido na via de resposta ao estresse no retículo endoplasmático chamada de UPR (Resposta a proteínas mal enoveladas), é induzido em macrófagos durante a infecção por *Brucella* (Qin et al., 2008). Uma dessas respostas ao estresse no retículo é a indução de autofagia dependente de IRE1 α . De fato, estudos já demonstraram que IRE1 α é ativado 4

horas após a infecção de células Hela por *B. abortus* demonstrando a ativação da UPR durante a fase inicial da infecção, no estágio de eBCV (Taguchi et al., 2015). A ativação de IRE1 α após a infecção por *Brucella* levou a formação de vesículas autofágicas que se fundem com o eBCV para dessa forma, promover a biogênese do rBCV através do acúmulo de membranas derivadas do retículo endoplasmático e exclusão de membranas endossômicas (Celli et al., 2015). De fato, a *Brucella* pode estar envolvida em um processo autofágico não canônico, subvertendo diferentes proteínas associadas a autofagia, a fim de promover a adição de membranas provenientes do RE no eBCV (Celli et al., 2015). Em um estudo de Starr e colaboradores (2012), foi demonstrado a presença de *B. abortus* em estruturas membranares semelhantes a autofagossomos que foram chamados de aBCVs. Os BCVs autofágicos apresentam características de endossomos tardios e ausência de marcadores de retículo endoplasmático, tornando-os semelhantes aos autofagossomos em maturação. Essa conversão do rBCV em aBCV envolve as proteínas de iniciação autofágica Beclin1, ATG14L e ULK1 (Starr et al., 2008; Celli et al., 2015). Assim, o aBCV parece exercer um papel fundamental na conclusão do ciclo celular de *Brucella* após sua replicação, uma vez que a formação do aBCV contribui para a liberação desse patógeno a partir da célula hospedeira (Celli et al., 2015).

1.5 Resposta Imune contra à *Brucella* spp.

Bactérias intracelulares são capazes de sobreviver e replicar-se dentro de células do hospedeiro, como por exemplo fagócitos. Essas células efetoras fagocitam e eliminam diversos patógenos. Contudo, as bactérias intracelulares exploram mecanismos de evasão que permitem sua sobrevivência nesse ambiente hostil. As ferramentas do sistema imune que controlam a infecção por patógenos intracelulares correspondem aquelas que ativam os mecanismos celulares que tornam a célula infectada apta a destruir e eliminar o microorganismo ou também a eliminação da própria célula infectada, fazendo com que o patógeno seja exposto a outros componentes efetores do sistema imunológico (Kaufmann, 1993; Abbas et al., 2015).

1.5.1 Resposta imune inata à *Brucella* spp.

A resposta imune inata atua de forma crítica no controle de infecções agudas pela *Brucella* em seres humanos e animais. Para desencadear uma resposta efetiva contra o patógeno, é necessária uma primeira linha de reconhecimento desta bactéria pelo sistema imune inato que é composto por barreiras físicas, componentes humorais como proteínas do sistema complemento e componentes celulares (Kawai, Akira; 2007). Várias estruturas conservadas do patógeno, coletivamente conhecidas como “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs), estão implicados na ativação da resposta imune inata do hospedeiro contra a *Brucella*. Os PAMPs são detectados por um conjunto de receptores chamados “receptores de reconhecimento de padrões” (PRRs) presentes em células do sistema imune inato como, por exemplo, em macrófagos e células dendríticas. Dentre os PRRs, destacam-se os receptores transmembrânicos semelhantes a Toll (TLRs), e receptores citosólicos semelhantes a NOD (Abbas, et al., 2015).

Ao serem reconhecidos por estes receptores TLRs, os PAMPs induzem uma sinalização intracelular. Sob identificação do ligante cognato, os TLRs irão levar a ativação de vias imunológicas através de moléculas adaptadoras como TRIF e MyD88, que culminam na ativação de fatores de transcrição como IRF3/IRF7 e NF- κ B e consequentemente ativação de múltiplos genes de citocinas pró-inflamatórias dentre elas IL-12 e TNF- α , como também a ativação de proteínas cinases MAPKs que possuem várias funções biológicas. (O'Neill and Bowie, 2007).

Apesar do LPS de *B. abortus* ser um fraco ativador de TLR4, a proteína da membrana externa OMP-16 é capaz de levar a ativação de TLR4 e consequentemente, desencadear a produção de citocinas inflamatórias relacionadas a ativação desse receptor. *B. abortus* também é capaz de ativar o receptor TLR2 através de sua lipoproteína de membrana OMP-16, Contudo, a ativação desses receptores não está associada com a eliminação do patógeno (Pasquevich et al., 2010). O receptor TLR9 mostrou ser ativado por motivos CpG derivados do DNA da *Brucella abortus*, além de estar relacionado com a restrição da infecção (Gomes et al., 2016; Weiss et al., 2005).

Além dos TLRs, os receptores do tipo NOD que compreendem proteínas citosólicas, também são capazes de reconhecer *B. abortus*. Estas proteínas são formadas por três

domínios, sendo eles, um domínio efetor N terminal variável, um domínio central do tipo NOD e uma porção C terminal com sequências ricas em leucinas. O reconhecimento de PAMPs se dá pela cauda com sequências ricas em leucinas, a qual, quando recrutada, permite a oligomerização do domínio central do tipo NOD e ativação do domínio efetor. A subfamília NLRP de receptores do tipo NOD respondem a PAMPs com complexos de sinalização conhecidos como inflamassomas (Park et al., 2007).

Os inflamassomas oligomerizam para formar uma plataforma molecular constituída por um complexo proteico que controla a produção de citocinas próinflamatórias como interleucina 1- beta (IL-1 β) e interleucina -18 (IL-18) (Rathinam et al., 2012).

Os inflamassomas canônicos são compostos por três componentes principais, sendo eles, uma caspase inflamatória como por exemplo, Caspase-1, uma molécula adaptadora como ASC, e uma proteína sensora como por exemplo, NLRP1, NLRP3 NLRC4 e AIM2. Cada um destes inflamassomas possuem diferentes receptores de reconhecimento de padrões participando do reconhecimento de produtos microbianos específicos ou sinais de estresse celular (Marim et al., 2017).

O inflamassoma de AIM2 (*Absent in melanoma 2*), é capaz de reconhecer DNA de dupla-fita no citosol da célula (Broz, Dixit, 2016; Marim et al., 2017). Estudos envolvendo animais deficientes em AIM2 destacaram a importância dessa molécula na defesa do hospedeiro contra infecções por vírus de DNA e infecções por bactérias intracelulares. (Jones et al., 2010; Sauer et al., 2010). Recentemente nosso grupo demonstrou que AIM2 é necessário para o controle da infecção pela *Brucella abortus* em camundongos. Neste trabalho, animais deficientes em AIM2 apresentaram uma resistência reduzida à *B. abortus* 1, 3 e 6 semanas após a infecção quando comparados com animais C57BL/6, resultado determinado pela contagem de UFCs do baço dos animais. Além disso, eles demonstraram ainda a co-localização de AIM2 com DNA de *B. abortus* em macrófagos de animais C57BL/6. Em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que o DNA de *B. abortus* é capaz de ser reconhecido por AIM2 e esta molécula apresenta um papel no controle da infecção por este patógeno (Costa-Franco et al., 2017).

A *B. abortus* também é capaz de desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3 (Gomes et al., 2013). Essa ativação pode ocorrer em resposta a diferentes estímulos, como ATP extracelular, β amilóides, insultos ambientais como sílica, radiação UVB além de

microorganismos e seus produtos específicos, como RNA e toxinas bacterianas formadoras de poros, por exemplo, nigericina, entre outros (Broz, Dixit, 2016). Em um estudo do nosso grupo, foi demonstrado que BMDMs deficientes em NLRP3 ou ASC apresentavam uma menor secreção de IL-1 β e menor ativação de caspase-1 em comparação com BMDMs de animais selvagens. Além disso, quando BMDMs de animais selvagens eram infectados com *B. abortus* deficiente no sistema de secreção do tipo IV, havia uma redução na secreção de IL-1 β em relação a BMDMs infectados com *B. abortus* selvagem. Esses dados sugerem que *B. abortus* é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3/ASC de maneira dependente do sistema de secreção do tipo IV. *In vivo*, camundongos deficientes para NLRP3, ASC e Caspase-1 foram mais suscetíveis à infecção por *B. abortus* do que os animais selvagens, sugerindo que inflamassomas dependentes de ASC contribuem para a proteção do hospedeiro contra a infecção por essa bactéria. (Gomes et al., 2013).

Em 2011, Kayagaki e colaboradores descreveram a existência de uma via de ativação de caspase 1 não canônica dependente de caspase-11. Nesta via não canônica, a caspase-11 murina atua na ativação de caspase-1 de forma dependente de NLRP3 e ASC.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a *B. abortus* desencadeia a ativação do inflamassoma não-canônico dependente de caspase-11 e da gasdermina-D, uma molécula que atua como substrato tanto de caspase-11 quanto de caspase-1, uma vez clivada, o fragmento N-terminal é recrutado para a membrana celular levando à formação de poros na membrana. No trabalho, o LPS de *B. abortus* foi identificado como o PAMP responsável pela ativação de caspase-11. Além disso, a *B. abortus* foi capaz de desencadear a formação de poros e piroptose dependente de caspase 11 em BMDMs. *In vivo*, camundongos deficientes em caspase-11 ou gasdermina eram mais suscetíveis à infecção por *B. abortus* em comparação com camundongos selvagens ou deficientes em caspase-1, demonstrando que gasdermina e caspase 11, mas não caspase-1, são importantes para o controle da replicação de *B. abortus* em camundongos.

Demonstramos que durante a infecção por *B. abortus* a maquinaria das GBPs (proteínas ligadoras de guanilato) são importantes para o rompimento do BCV (Costa Franco et al., 2017) e, principalmente as GBPs 4 e 5 participam do reconhecimento do LPS de *B. abortus* por caspase-11, e dessa forma, contribuem para a ativação do inflamassoma não canônico (Cerqueira et al., 2018). As GBPs compreendem uma classe de GTPases fortemente

estimuladas por IFNs do tipo I e apresentam efeitos antimicrobianos contra bactérias intracelulares, como *B. abortus*. Essas proteínas podem atuar tanto diretamente na lise de patógenos quanto nos PVs, destruindo o nicho microbiano e expondo PAMPs como por exemplo, o LPS ou ácidos nucléicos, à mecanismos imunológicos do hospedeiro (Kim et al; 2011; Gomes et al., 2019).

Dados da literatura sugerem uma intrincada rede de vias de sinalização durante a ativação do inflamassoma não-canônico e da piroptose dependente de gasdermina. Com a participação das GBPs, a caspase-11 é ativada pelo LPS citosólico derivado de vacúolos contendo patógenos, dando início a via do inflamassoma não canônico. Após a clivagem de gasdermina pela caspase-11, ocorre a formação de poros nas membranas celulares, culminando na piroptose. Além disso, o efluxo de K⁺ pode induzir a montagem do inflamassoma de NLRP3, resultando na ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β . Além da via não-canônica de ativação do inflamassoma, inflamassomas canônicos como AIM2 desencadeiam piroptose dependente de gasdermina, sugerindo que há um “*crosstalk*” dessa via de sinalização. As GBPs que atingem vacúolos contendo patógenos podem liberar além de LPS, outros fatores, como por exemplo, DNA, permitindo a ativação de várias vias ao mesmo tempo (Figura 5), (Gomes et al., 2019). As maneiras pelas quais os GBPs detectam e atingem os vacúolos de patógenos permanecem pouco caracterizados; no entanto, em células de camundongos infectadas com *Yersinia* ou *Legionella*, o recrutamento de GBPs para os vacúolos está ligado ao sensor de dano vacuolar Galectina-3 (Feeley et al., 2017).

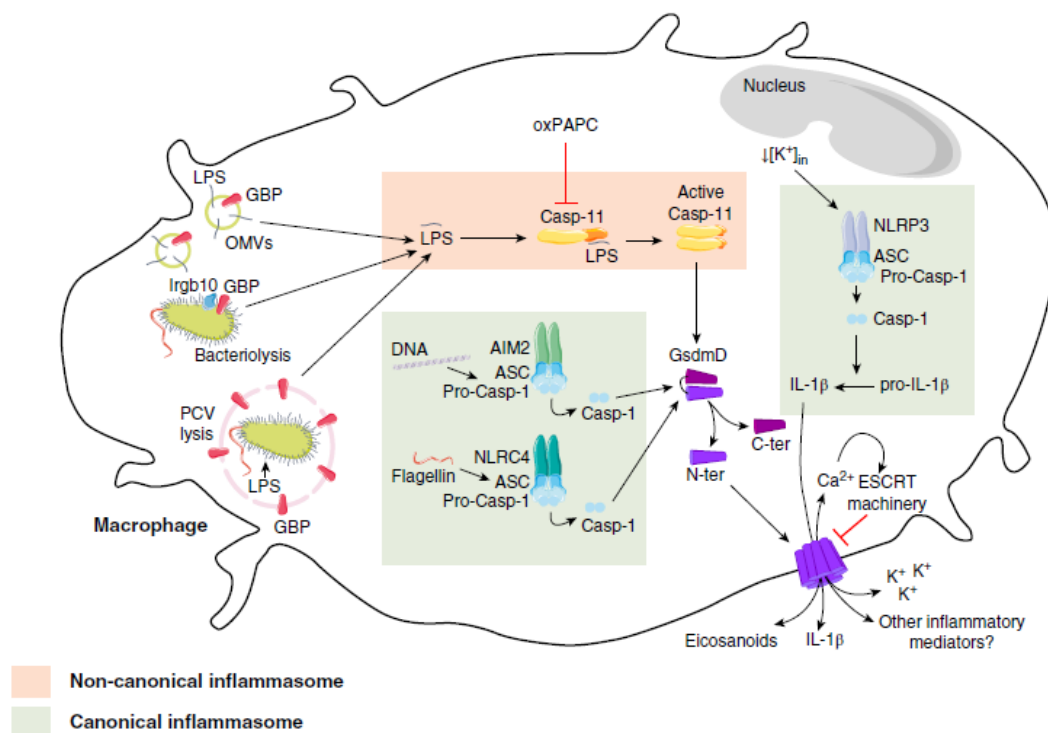


Figura 5: Ativação do inflamassoma não canônico levando a piroptose e restrição de infecções bacterianas

Fonte: Gomes et al., 2019. Adaptado

Vários outros tipos de receptores de membrana plasmática e citoplasmáticos são capazes de transmitir sinais de ativação similares aos TLRs e NODs e promover respostas inflamatórias. (O'Neill and Bowie, 2007). Receptores que reconhecem carboidratos na superfície de microorganismos são capazes de facilitar a fagocitose dos mesmos e induzir a secreção de citocinas que promovem subsequentes respostas imunes adaptativas (Cerliani et al., 2017).

Algumas lectinas animais solúveis ou associadas à membrana da célula hospedeira podem funcionar como receptores de reconhecimento de padrões, facilitando e iniciando respostas imunes contra patógenos. Sabe-se que as galectinas podem interagir diretamente com glicanos da superfície bacteriana regulando as funções leucocitárias e as respostas inflamatórias do hospedeiro (Vasta, 2009). Estudos demonstraram que a Galectina-3 pode reconhecer padrões moleculares associados à bactérias e dessa forma, funcionar como um PRR, reconhecendo bactérias e modulando a produção de citocinas inflamatórias (Sato et al.,

2009). Dessa forma, o papel potencial das galectinas como PRRs tornou-se uma área de maior atenção.

Além disso, durante infecções bacterianas, a via de sinalização de TLRs MyD88-independente, é capaz de induzir a fosforilação de elementos reguladores de interferon (IRFs), como IRF-3 e IRF7, culminando na produção de interferons do tipo I, em particular IFN- β , seguido da ativação de genes induzidos por interferons (Fitzgerald et al., 2003).

1.5.2 Sinalização de interferon tipo I e seu papel durante infecções bacterianas

Os interferons do tipo I foram descritos inicialmente como produtos secretados por células infectadas por vírus, e são responsáveis por induzir um estado antiviral nas células interferindo na replicação viral eficiente. Essas moléculas consistem em uma família de genes homólogos de IFN- α e um único gene de IFN- β e podem ser expressos em várias células em resposta à PAMPs (Decker et al., 2005; Boxx, Cheng; 2016). Atualmente, sabe-se que além dos vírus, vários patógenos como protozoários, fungos e bactérias induzem a expressão de genes relacionados ao INF do tipo I (Kovarik et al., 2016).

A produção de IFN- β estimula uma cascata de sinalização através do receptor de IFN do tipo I, IFN- $\alpha\beta$ R. A sinalização desse receptor pelos IFNs do tipo I leva a fosforilação de Janus cinases (Jak1 e Tyk2) e posterior ativação dos fatores de transcrição STAT1 e STAT2 culminando na indução da transcrição de genes contendo em seus promotores elementos responsivos à estimulação por interferon como por exemplo, IRF3 que consiste no principal ativador de transcrição do gene IFN- β (Brierley et al., 2002; Boxx, Cheng; 2016). A fosforilação de IRF3 por TBK1 amplifica positivamente os efeitos da sinalização do IFN do tipo I e dessa forma, IFN- α e IFN- β podem interagir novamente com seu receptor, levando a um feedback positivo reestabelecendo a sinalização (Gomes et al., 2012, Decker et al., 2005; Kovarik et al., 2016).

As bactérias desencadeiam a ativação da via de IFN do tipo I principalmente após o reconhecimento de ácidos nucleicos bacterianos por sensores citosólicos (Monroe et al., 2010; Boxx, Cheng; 2016). Os eventos de sinalização que ocorrem após o reconhecimento do DNA bacteriano envolvem a via de STING que ativa TBK1 culminando na fosforilação de IRF3 conduzindo a transcrição do gene de IFN- β (Kovarik et al., 2016). Os mecanismos efetores

dos IFNs do tipo I derivam principalmente de produtos de genes que são regulados transcricionalmente por essa sinalização. Através dessa via, ocorre a expressão de diversos fatores de resistência do hospedeiro, incluindo IRGs e GBPs (Pilla et al., 2016; Kim et al., 2016).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o sensor de DNA STING detecta a infecção por *B. abortus* e desencadeia uma resposta de IFN tipo I e uma cascata de sinalização dependente de IRF, levando à regulação de vários genes, incluindo GBPs (Costa-Franco et al., 2017). Durante as infecções bacterianas, o IFN tipo I é frequentemente produzido, porém seus efeitos são conflitantes e nem sempre favorecem a resposta imune do hospedeiro contra a infecção (Gomes et al., 2012; Boxx, Cheng; 2016; Kovarik et al., 2016). Assim, os IFNs do tipo I são considerados citocinas imunomoduladoras capazes de aumentar ou diminuir a resposta imune, dependendo do contexto.

A ativação da resposta imune pelos IFNs do tipo I é vantajosa para o hospedeiro durante a infecção por *L. pneumophila*, uma bactéria intracelular causadora de pneumonia. Nesse estudo, macrófagos infectados por *L. pneumophila* produziram IFN- β de forma dependente de STING e IRF3 e a produção dessa citocina inibiu de forma eficiente a replicação de *L. pneumophila* em macrófagos. Além disso, esse estudo demonstrou que camundongos deficientes para o receptor de IFN do tipo I exibiram maior carga bacteriana no pulmão e baço em comparação com camundongos selvagens, demonstrando o papel protetor dessa via no controle da infecção pelo hospedeiro (Lippmann et al., 2011). Da mesma forma, a sinalização de IFN tipo I é protetora contra *H. pylori*, patógeno que pode infectar o estômago e causar gastrite crônica aumentando o risco de câncer de estômago e úlceras gástricas. Estudos *in vivo* mostraram que camundongos deficientes para IFN- $\alpha\beta$ R infectados oralmente com *H. pylori* apresentaram maiores cargas bacterianas no estômago em comparação com camundongos selvagens. Esse fenótipo foi acompanhado de menores níveis da quimiocina CXCL10 sugerindo que IFNs tipo I promovem defesa contra *H. pylori* ao estimular a inflamação induzida por CXCL10. (Watanabe et al., 2010; Kovarik et al., 2016).

Em contraste, há uma gama de bactérias que induzem IFN do tipo I, mas desenvolvem um fenótipo prejudicial ao hospedeiro. (Gomes et al., 2012; Kovarik et al., 2016). Nesse cenário, já foi demonstrado que a sinalização de IFN tipo I foi prejudicial durante a infecção por *L. monocytogenes*, onde um menor título de bactérias foi recuperado no fígado de

camundongos deficientes para IFN- $\alpha\beta$ R em comparação com camundongos selvagens. Além disso, a produção de IFN- β diminuiu a expressão das subunidades do receptor de IFN do tipo II diminuindo assim a responsividade de macrófagos e DCs ao IFN- γ . Nesse contexto, o mecanismo de *cross talk* antagônico entre IFN do tipo I e IFN do tipo II (IFN γ) pode ser um aspecto importante envolvido na ação prejudicial do IFN do tipo I, visto que o IFN γ apresenta um papel importante no controle da infecção por *L. monocytogenes* (Rayamajhi et al., 2010).

Alterações semelhantes na indução de respostas de IFN do tipo I parecem ser responsáveis pelo aumento da suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *B. abortus*. Nosso grupo revelou um papel interessante do IFN tipo I durante a infecção por *B. abortus* (de Almeida et al., 2011). A ausência da sinalização de IFN tipo I aumentou a proteção do hospedeiro à infecção por *B. abortus*, uma vez que o camundongos deficientes para o receptor de IFN do tipo I foram mais resistentes à infecção em comparação com camundongos selvagens. Além disso, o baço de animais IFNAR KO infectados com *Brucella* exibiram uma redução na apoptose esplênica em comparação com animais selvagens, sugerindo que a sinalização de IFN tipo I aumenta a apoptose das células imunes causando o aumento da suscetibilidade a *B. abortus* (Almeida et al., 2011).

Vale ressaltar que os efeitos benéficos ou prejudiciais da sinalização de IFN tipo I não se correlacionam com a classificação dos patógenos em Gram-positivos e negativos, extracelulares e intracelulares, ou com suas rotas de infecção. Dessa forma, até o momento, nenhum padrão unificador foi descrito (Kovarik et al., 2016).

1.5.3 Resposta Imune Adaptativa à *Brucella* spp.

Na resposta imune adaptativa contra bactérias intracelulares como a *Brucella* spp., os mecanismos de defesa são mediados principalmente por linfócitos T e seus produtos. A resposta humoral mediada por anticorpos desempenha a função de opsonizar o patógeno nos primeiros momentos da infecção, porém como a *Brucella* é um patógeno intracelular, os anticorpos não são capazes de diminuir a taxa de replicação intracelular da bactéria. Dessa forma a proteção contra *Brucella* spp. é depende da imunidade celular mediada por linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ citotóxicos (Araya et al., 1989; Skendros, Boura, 2013).

O subgrupo de células T CD4⁺ Th1 é induzido por microorganismos que são ingeridos por fagócitos. A resposta imune Th1 contra *Brucella spp* leva à secreção de IFN γ por esses linfócitos, embora outros subgrupos de células, como linfócitos T CD8⁺, linfócitos T $\gamma\delta$ e células NK também participem da produção desta citocina (Yingst et al., 2003; Baldwin et al., 2006). O IFN γ é uma citocina capaz de ativar os mecanismos bactericidas dos macrófagos, fazendo com que estas células produzam reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio, enzimas proteolíticas que destroem o patógeno fagocitado, além de promover a expressão de moléculas coestimulatórias nas APCs e estimular a citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ (Skendros, Boura, 2013).

A relevância de células T CD8⁺ ocorre pela sua capacidade de eliminação de células alvo infectadas com *Brucella*. Oliveira e colaboradores (1995), demonstraram a contribuição de células T CD8⁺ no controle da infecção por *Brucella* uma vez que camundongos deficientes em linfócitos T CD8⁺ (que apresentam MHC de classe I), foram mais susceptíveis quando comparados com animais selvagens ou animais deficientes em células T CD4⁺ (que apresentam MHC de classe II), destacando a importância dessas células no controle da infecção por *Brucella*.

Além do seu papel na resposta imune inata, as galectinas que compreendem, são capazes de influenciar a resposta imune adaptativa. Estas moléculas podem modular a maturação e diferenciação de células B, além de influenciar na sobrevivência e homeostase de células T e dessa forma, modular a resposta imunológica contra patógenos (Vasta, 2009).

1.6 Galectinas

As lectinas representam proteínas que possuem a capacidade de se ligar de forma reversível e específica a carboidratos. São evolutivamente conservadas e podem ser encontradas em diferentes organismos, como animais, plantas e microorganismos (Zeng et al., 2012). Entre as várias famílias de lectinas, as Galectinas são proteínas que possuem a capacidade de se ligar a glicídeos, tendo afinidade principalmente por moléculas contendo β -galactosídeos (Quattroni et al., 2012). Estruturalmente, as galectinas contêm domínios característicos de reconhecimento de carboidratos, (CRDs), de cerca de 130 aminoácidos (Vasta et al., 2012; Collins et al., 2013) que são responsáveis pelas ligações à β -galactosídeos.

Nesse contexto, a estrutura mínima reconhecida pelas galectinas é o dissacarídeo N-acetilactosamina (LacNAc), que é encontrado em N-glicanos e O-glicanos e pode ser apresentado como unidades múltiplas (poli-LacNAc) nas glicoproteínas da superfície celular (Hirabayashi et al., 2002).

Descritas em 1970, a princípio, as galectinas foram inicialmente conhecidas por se ligarem apenas a glicanos endógenos e mediarem os processos de desenvolvimento, incluindo a diferenciação celular e a organização dos tecidos e, mais recentemente, a regulação da resposta imune. No entanto, com mais estudos relacionados ao papel destas proteínas, tornou-se claro que as galectinas também se ligam a glicanos não próprios na superfície de microrganismos patogênicos como vírus, bactérias, fungos e parasitas e dessa forma, participam do reconhecimento de microrganismos e de funções efetoras tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa. (Vasta et al., 2009). A maioria das galectinas são proteínas solúveis não glicosiladas, embora tenham sido relatadas galectinas com domínios transmembrana (Gorski et al., 2002; Lipkowitz et al., 2004).

Até o momento, 15 galectinas de mamíferos foram descritas, e com base em suas características estruturais, essas proteínas foram classificadas em três tipos: prototípicas, em repetição em tandem e quimérica (Figura 3a). As galectinas prototípicas contêm apenas um domínio de reconhecimento de carboidratos por subunidade e são geralmente homodímeros de subunidades não covalentemente ligadas e são representadas pelas Gals 1,2,5,7,10,11,13,14 e 15. Em contraste, nas galectinas em repetição em tandem, dois CRDs são unidos por um peptídeo ligante funcional. Esse grupo é representado pelas galectinas 4, 6, 8, 9 e 12. (Vasta, 2019). Por fim, a galectina do tipo quimérica, representada unicamente pela Galectina 3, apresenta um CRD na região C-terminal e um grande domínio de ligação à proteína na região N-terminal (Vasta et al., 2012; Alvarez, Ortega, 2017). A metade C-terminal da Gal-3 é dobrada em uma forma de sanduíche β com um núcleo de triptofano e um sítio de ligação de carboidrato não canônico que medeia a interação com açúcares. Já na sua região N terminal, de cerca de 120 resíduos, há um domínio rico em glicina e prolina que está envolvido na capacidade de Gal-3 de oligomerizar com outras moléculas de Gal-3 ou estabelecer interações proteína-proteína com diferentes moléculas (Miller et al., 2016; Ippel et al., 2016).

No entanto, existem diferenças nas preferências de ligação aos glicanos de membros individuais da família das galectinas, o que pode ser a base das diferenças funcionais em suas

atividades biológicas (Hirabayashi et al., 2002; Stowell et al., 2008; Rabinovich, Toscano; 2009). As variações nas preferências de ligação aos glicanos podem estar associadas, com a extensão da ramificação da molécula ligante e com modificações de sacarídeos terminais, por exemplo, sialilação ou fucosilação (Patnaik et al., 2006).

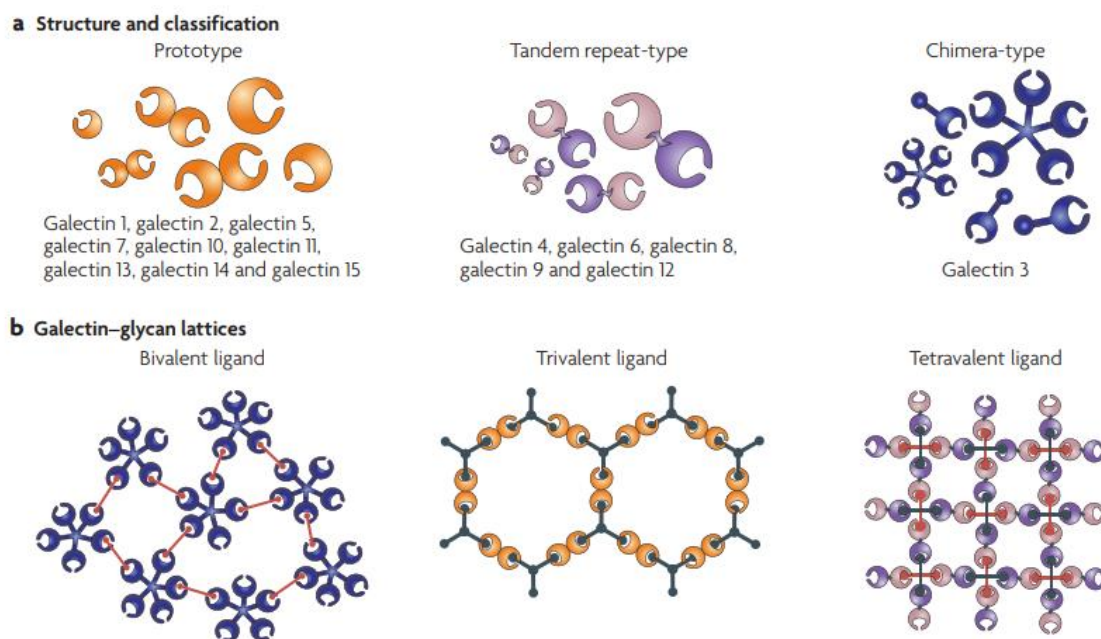


Figura 6: Estrutura das Galectinas e interações Galectinas – glicanos (*Lattices*)

Fonte: Rabinovich, Toscano; 2009 - Adaptado

Embora as galectinas não possuam um peptídeo sinal de secreção típico, elas estão presentes não apenas no citosol e no núcleo celular, mas também no espaço extracelular. Do citosol, as galectinas podem ser direcionadas para a secreção por mecanismos não clássicos, possivelmente por translocação direta através da membrana plasmática (Patterson et al., 1997). Uma vez no espaço extracelular, elas podem se ligar simultaneamente aos glicanos da superfície celular formando estruturas ordenadas de galectina-glicano, muitas vezes chamadas de *lattices*, na superfície celular (Figura 5b). Podem se ligar à frações de carboidratos na matriz extracelular ou a glicanos em células vizinhas, levando à adesão celular. Da mesma forma, as galectinas também podem formar redes homogêneas na superfície celular que podem ativar vias de sinalização de relevância funcional no controle da endocitose do receptor, interações patógeno-hospedeiro e ativação e homeostase das células imunes (Figura 4). Assim, essas proteínas são importantes e desempenham vários papéis, dentre eles

interações célula-célula, sinalização celular e resposta imune (Taylor et al., 2003; Vasta et al., 2009).

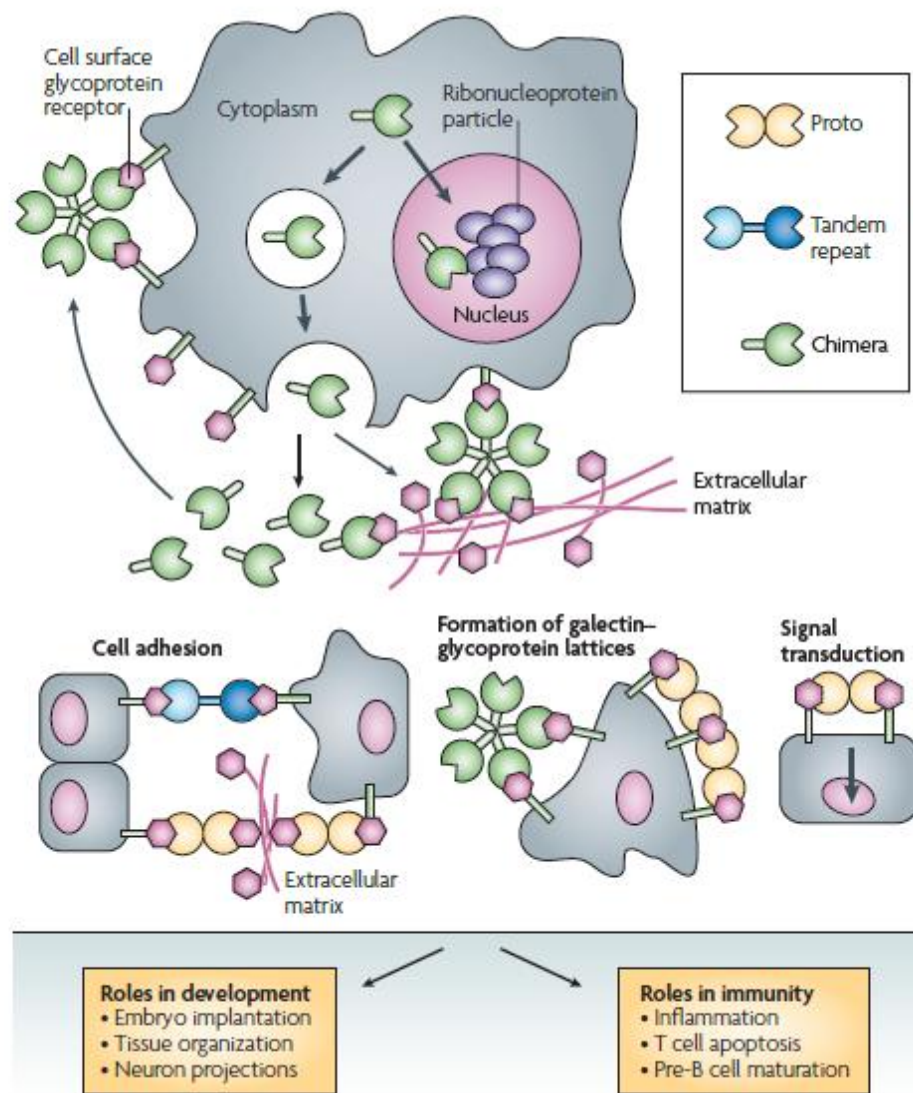


Figura 7: Atividade de ligação e papéis biológicos dos tipos de Galectinas

Fonte: Vasta, 2009.

Dentro do sistema imunológico, as galectinas são expressas por todas as células imunes, seja constitutivamente ou de forma induzível, e são reguladas positivamente por células B e T ativadas, macrófagos inflamatórios, células natural killer (NK) e células T regulatórias (Rabinovich, Toscano;2009). Na verdade, algumas galectinas podem atuar como alarminas, convertendo sinais associados a danos e a patógenos em respostas imunes inatas (Yang et al., 2008).

Praticamente todas as células bacterianas, assim como muitos vírus, fungos e parasitas, apresentam carboidratos de superfície. Visto que as galectinas podem se ligar diretamente a estes carboidratos, vários estudos demonstram o potencial papel dessas proteínas atuando no reconhecimento e interação direta com patógenos e na modulação da resposta imune durante as complexas interações entre os hospedeiros e microorganismos. Nesse contexto, os dados da literatura mostraram que a Galectina-1 pode inibir a adsorção e a fusão viral de *Nipah virus*, causador de encefalite grave, em células endoteliais ligando-se a N-glicanos ligados a proteína do envelope viral (Lee, 2007). Além de bloquear diretamente a fusão celular de *Nipah virus*, a gal-1 também promoveu uma resposta inflamatória inata com produção de IL-6 e TNF- α por células dendríticas, facilitando a resposta do hospedeiro à infecção viral (Levroney et al., 2005).

Durante a infecção por *Leishmania major* foi demonstrado que o lipofosfoglicano (LPG) da superfície dos parasitas é reconhecido pelas galectinas 3 e 9. (Pelletier, Sato; 2002; Pelletier et al., 2003). A ligação da Galectina-3 a *L. major* durante os estágios iniciais da infecção levou a ativação de vias de sinalização que culminaram a uma resposta imune do tipo Th1 induzindo assim uma forte inflamação local e consequente restrição da infecção. Pelletier e Sato, 2002 demonstraram, pela primeira vez, um mecanismo de como a susceptibilidade da Galectina-3 ao ataque proteolítico de *L. major* determina as manifestações clínicas cutâneas ou viscerais específicas da infecção por esse patógeno. As galectinas também já foram descritas por se ligarem à oligomanosídeos de *Candida albicans* demonstrando que as galectinas também são capazes de reconhecer e se ligarem à fungos (Fradin et al., 2000).

Além disso, infecções bacterianas podem modular a expressão das galectinas, que por sua vez regulam a função leucocitária e as respostas inflamatórias. Tanto bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus pneumoniae*, e bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Pseudomonas aeruginosa*, exibem carboidratos de superfície que são ligantes das Galectinas (Vasta et al., 2009). Foi demonstrado que durante a infecção de macrófagos por *Listeria monocytogenes* a galectina-8 promove a autofagia antibacteriana, reconhecendo os glicanos do hospedeiro em membranas vacuolares rompidas e interagindo com a proteína adaptadora de autofagia NDP52 (Weng et al., 2018).

Avanços recentes permitiram a associação das Galectinas com doenças como o câncer sugerindo o possível desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e diagnósticas baseadas na análise de expressão e indução diferencial dessas proteínas. Os perfis de expressão gênica e proteica frequentemente mostram a regulação positiva de galectinas em vários tumores e lesões metastáticas, que podem ser usadas para delinear uma assinatura de glicosilação que indica mau prognóstico (Rabinovich, Toscano; 2009).

1.7 Galectina-3

A Galectina-3, apresenta uma estrutura única entre as galectinas, e é capaz de se oligomerizar e formar pentâmeros, aumentando assim a capacidade de interação com seus ligantes. O gene humano da Galectina-3 (LGALS3), abrange 17 Kb e contém 6 éxons e 5 introns. Ele apresenta uma janela de leitura aberta de 750 pb que se traduz em uma proteína de 250 aminoácidos de aproximadamente 31 a 35 kDA (Kadrofske et al., 1998).

Essa proteína é amplamente distribuída, podendo ser expressa em uma variedade de tecidos, como pulmões, trato digestivo e urogenital, coração e rins. Além disso, a Galectina-3 é altamente expressa em células imunes como monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, bem como em fibroblastos e células epiteliais. Em nível celular, a Galectina-3 pode estar localizada no citoplasma, núcleo e membranas, podendo ser encontrada no meio extracelular após ser secretada por células estimuladas, por exemplo, com LPS e IFN- γ (Alvarez; Ortega, 2017).

Por ser uma proteína expressa de maneira constitutiva por diferentes células, a Galectina-3 está envolvida em uma série de eventos biológicos, e alterações em seus níveis de expressão podem estar relacionados com processos patológicos, incluindo desenvolvimento de tumores, degeneração neural, aterosclerose, diabetes e reparo de feridas (Yang et al., 2008). A expressão de Gal-3 é modulada em muitos tipos de cânceres e há evidências que sua expressão é necessária para a progressão de tumores. Os mecanismos pelos quais a Gal-3 está envolvida com a progressão da doença pode estar relacionado com a sua capacidade de interação com oncogenes e com fatores de transcrição (Shimura et al., 2005; Liu, Rabinovich; 2005; Yang et al., 2008).

Com relação aos processos inflamatórios, têm sido atribuído importantes papéis para a Gal-3. Essa proteína participa de diferentes processos, incluindo imunidade contra patógenos e inflamação aguda e crônica. Estudos recentes demonstraram que a Galectina-3 pode reconhecer padrões moleculares associados à patógenos e dessa forma, funcionar como um PRR, reconhecendo bactérias; ligando-se diretamente ao patógeno, mediar efeitos bactericidas e modificar eventos de sinalização inflamatória. Além de reconhecer PAMPs, a Galectina-3 também pode ser liberada como um padrão molecular associado ao dano (DAMP) (Sato et al., 2009).

Os primeiros relatos funcionais da Gal-3 dentro do sistema imunológico focaram principalmente em suas atividades pró-inflamatórias para macrófagos e monócitos, como evidenciado pela indução de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio por essas células após exposição à Gal-3 (Yamaoka et al., 1995; Cerliani et al., 2017; (Alvarez; Ortega, 2017).

A Galectina-3 também têm sido caracterizada como um sensor de dano vacuolar, e dessa forma, estudos vêm demonstrando a participação e a importância da Gal-3 na imunidade inata. Um trabalho recente demonstrou que o recrutamento de GBP2 para vacúolos contendo *Legionella* e *Yersinia* ocorre de forma dependente de Galectina-3. (Feeley et al., 2017). As GBPs podem atuar na ruptura de PVs, são altamente conservadas entre os vertebrados e se encontram principalmente no citoplasma, associados a membranas intracelulares, dentro de estruturas semelhantes a vesículas ou no núcleo e exibem efeitos antimicrobianos contra bactérias intracelulares, vírus e protozoários. A (Kim et al; 2011 Gomes et al., 2019). Foi observado que a presença de sistemas de secreção bacterianos direciona a Galectina-3 para vacúolos contendo patógenos, e que a entrega de GBP1 e GBP2 para vacúolos de *Legionella* e *Yersinia* é substancialmente menor em células deficientes em Galectina-3. De fato, estes resultados ilustraram que os sistemas de secreção bacterianos estimularam o recrutamento de GBPs antimicrobianos para os vacúolos desses patógenos de forma dependente de Galectina-3, representando parte de um programa coordenado de defesa do hospedeiro. Além disso, a associação de Gal-3 com os PVs são dependentes do reconhecimento de glicanos do hospedeiro restritos ao lúmen vacuolar, mas que são expostos ao citosol durante a inserção de sistemas de secreção bacterianos em PVCs (Feeley et al., 2017).

Em um estudo de Paz e colaboradores (2010), a Galectina-3 intracelular foi caracterizada como um sensor de ruptura vacuolar que pode detectar bactérias como a *Shigella flexneri* que entram ativamente no citoplasma da célula hospedeira. O recrutamento de Gal-3 durante a infecção por *Shigella* foi dependente do sistema de secreção do tipo III, uma vez que células infectadas com cepas mutantes deficientes para o T3SS, apresentaram uma menor indução e recrutamento de Gal-3 em comparação com células que foram infectadas com cepas de *Shigella* que apresentavam T3SS competente (Paz et al., 2010).

Diferentes infecções induzem um aumento na secreção de Galectina-3 por diferentes células. Na infecção por *Helicobacter pylori*, células epiteliais gástricas expressam uma maior quantidade de Galectina-3 em comparação com células não infectadas (Fowler et al., 2006).

Estudos demonstraram ainda que, a Galectina-3 poderia influenciar o curso da infecção por *Mycobacterium leprae*. A expressão de Galectina-3 foi estudada em duas formas de patologia ocasionada por *M. leprae*: a leprose tuberculóide, que é considerada a forma leve e autocontida, e a leprose lepromatosa, uma forma mais extensa e progressiva da doença. Embora a Galectina-3 não tenha sido detectável em lesões tuberculóides autolimitadas, sua expressão foi altamente regulada positivamente em macrófagos presentes nas lesões de pacientes com hanseníase virchoviana (Chung et al., 2013).

Além da interação da Galectina-3 com LPS de patógenos como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* através do reconhecimento das cadeias contendo β -galactosídios, Dumić e colaboradores (2016) ressaltam a capacidade de interação da Galectina-3 com LPS através da interação de seu domínio N-terminal com estruturas não glicanas como o lipídio A.

A Galectina-3 é capaz de alterar o curso de uma infecção através de seus efeitos em células imunológicas como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Estas células exibem um vasto repertório de receptores inatos para detectar patógenos ou moléculas endógenas liberadas por células danificadas (alarminas) ou secretadas por células ativadas. Após o reconhecimento desses sinais, os fagócitos se ativam e secretam citocinas pró-inflamatórias que levam a uma resposta imunológica contra o patógeno (Alvarez; Ortega, 2017).

Por outro lado, efeitos dependentes da Gal-3 durante infecções têm sido demonstrado para vários patógenos, incluindo *Listeria Monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhimurium* e *Toxoplasma gondii*, e a sua atuação pode estar associada a um prejuízo ao

hospedeiro. (Bernardes et al., 2006; Quattroni et al., 2012; Li et al., 2018; Weng et al, 2018). Diferentes mecanismos podem estar relacionado com o efeito prejudicial de Gal-3 durante processos infecciosos. Já foi anteriormente relatado que a Gal-3 pode se ligar à glicanos nas membranas de neutrófilos e inibir sua quimiotaxia em relação á quimiocinas clássicas, incluindo o análogo humano de KC, IL-8 (Baseras et al., 2012).

Um estudo demonstrou que durante um modelo de sepse induzida por punção de ceco em camundongos, a Gal-3 secretada durante a sepse limitou o tráfego de leucócitos para o foco infeccioso promovendo consequentemente uma maior disseminação bacteriana e piora de prognóstico em comparação com camundongos deficientes em Gal-3 (Ferreira et al., 2018).

Durante as interações com patógenos, a presença da Gal-3 pode ser conflitante, e, nem sempre ser benéfica à resposta imune do hospedeiro e os mecanismos pelos quais essa proteína exerce seu papel ainda não são claramente estabelecidos (Díaz-Alvarez; Ortega; 2017). Tomadas em conjunto, estas observações indicam que as Galectinas estão envolvidas em uma série de eventos e a indução dessas proteínas estão relacionadas com diferentes desfechos tanto em prcessos infecciosos quanto em processos que não envolvem necessariamente um patógeno.

2 JUSTIFICATIVA

A brucelose é adquirida principalmente através do contato com animais infectados, inalação de aerossóis contendo o patógeno ou, mais frequentemente, através do consumo de leite e derivados contaminados. Em todo o mundo, principalmente em países mediterrâneos da Europa, no norte e leste da África, no Oriente Médio, na Ásia sul e central, e nas Américas Central e Sul, a brucelose ainda é uma doença humana importante e muito frequentemente não reconhecida, e por sua vez, não reportada. A brucelose, principalmente aquela causada por *B. abortus*, já foi descrita em todo o Brasil. Além da contaminação dos consumidores de produtos de origem animal, a brucelose pode causar até 20% de perda da produtividade em rebanhos bovinos e tornar a carne, leite e seus derivados vulneráveis a barreiras sanitárias no mercado internacional, causando grandes perdas econômicas na pecuária (Santos et al., 2013). Portanto, estudos dos mecanismos envolvidos no controle da infecção por *B. abortus* são fundamentais para o controle da doença.

Recentemente, foi observado que a Galectina-3 é capaz de exercer difentes papéis durante a resposta imune e o reconhecimento de patógenos, podendo interagir diretamente com os mesmos ou promovendo o recrutamento de outras moléculas efetoras frente à infecção. Nesse cenário, foi demonstrado que a Galectina-3 promove o recrutamento de proteínas ligadoras de guanilato (GBPs) a vacúolos contendo patógenos. As GBPs são componentes essenciais da imunidade celular que são induzidas em resposta à sinalização do IFN do tipo I. Além disso, já foram descritos papéis da Galectina-3 na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, o papel da Galectina-3 durante a infecção por *B. abortus* ainda não estava bem estabelecido. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da Galectina-3 na resposta à infecção por *B. abortus*, a fim de melhor compreender mecanismos envolvidos na resposta a esse patógeno. Dessa forma, essa abordagem ajudará na elucidação da influência da Gal-3 na infecção pela *B. abortus*, contribuindo para o desenvolvimento de possíveis estratégias para o controle da infecção.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar o papel da Galectina-3 na infecção pela bactéria intracelular *Brucella abortus* em modelo murino.

3.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar a indução da Galectina-3 em macrófagos infectados com *B. abortus*.
- Avaliar o papel do sistema de secreção do tipo IV da *B. abortus* na indução de Gal-3 em macrófagos.
- Investigar o papel da Gal-3 na indução de respostas de IFN do tipo I durante a infecção por *Brucella abortus*.
- Avaliar o papel da Gal-3 no rompimento do vacúolo de *Brucella* e na expressão de GBPs.
- Determinar o papel da Galectina-3 na ativação do inflamassoma e na piroptose induzida por *B. abortus*.
- Avaliar o papel da Gal-3 na restrição da infecção por *B. abortus* em modelo murino de infecção *in vivo* e os mecanismos envolvidos nesse processo.

4. METODOLOGIA

4.1 – Bactérias

Nesse estudo, foram utilizadas bactérias da espécie *Brucella abortus* cepa 2308 e *Brucella abortus*-GFP obtidas da nossa coleção do laboratório. A cepa mutante de *B. abortus* $\Delta virB$ utilizada nesse estudo foi gentilmente cedida pelo Dr. Renato de Lima Santos da UFMG, Brasil (Mon et al., 2014). A cepa $\Delta virB$ foi obtida por troca alélica do gene *virB2*, gerando uma deleção polar de *virB2*.

Para as infecções, as bactérias foram cultivadas em meio BB (Brucella Broth) sob agitação a 37°C por 24 horas. Posteriormente, a cultura teve sua densidade óptica dosada a 600 nm em espectrofotômetro para a determinação da concentração de bactérias na solução. A quantidade necessária de cultura, de acordo com a multiplicidade de infecção (MOI) específica de cada experimento, foi centrifugada, e suspensa em meio DMEM a ser utilizado para infecção.

4.2 – Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (selvagem), camundongos deficientes em Galectina-3 (*Gal3-KO*) e camundongos deficientes em GBPs do cromossomo 3 (*GBPchr3 KO*) com o background genético de C57BL/6. Todos os animais utilizados são isogênicos e possuíam aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB- UFMG em microisoladores com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo claro/escuro controlados, dispondo de livre acesso a ração e água.

4.3 – Cultura e estímulo de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos C57BL/6 Gal-3 KO e GBPchr3 KO foram sacrificados e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. As extremidades desses ossos foram cortadas e foi injetado aproximadamente 5 mL de solução salina estéril por osso. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos e o precipitado de células foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina/Streptomicina e 1% Hepes. As culturas foram diferenciadas por 7 dias em estufa a 37°C, 5% CO₂ em meio DMEM suplementado com 1% de HEPES, 10% de soro fetal bovino (SFB), 20% de meio condicionado por células L929 (LCCM) fonte de M-CSF (importante para diferenciação de células progenitoras em macrófagos), 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de streptomicina. Após a diferenciação, os macrófagos foram coletados pela lavagem das monocamadas com PBS gelado, distribuídos em placas de cultura e cultivados em meio DMEM, contendo 1% SFB e 1% HEPES ou 10% SFB e 1% HEPES, dependendo do experimento.

4.4 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas

Para a quantificação de citocinas por ELISA, BMDMs foram dispostos em placas de 24 poços (5x10⁵ células/poço) e as culturas de esplenócitos foram dispostas em placas de 96 poços (1x10⁶ células/poço). Os BMDMs e esplenócitos foram então infectados com *B. abortus* com MOI 100. Como controle positivo, os BMDMs foram pré tratados com 1 µg de LPS de *E. Coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 4 horas e estimulados com 20 µM de nigericina (Sigma-Aldrich) por 30 minutos ou tratados somente com LPS por 24 horas. Após 24 horas, os sobrenadantes de BMDMs foram coletados e congelados a -80° C para posterior dosagem das citocinas IL-1β, TNF-α e CXCL10 quantificadas utilizando os kits de ELISA de IL-1β TNF-α e CXCL10 de camundongos (R&D systems Minneapolis, MN), de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Na cultura de esplenócitos, como controle positivo, utilizamos 1 µg de LPS de *E. Coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou concavalina A. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Após 12, 48 e 72 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80° C para posterior

dosagem das citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e CXCL10 na cultura de esplenócitos utilizando Kits de ELISA (R&D systems Minneapolis, MN), de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante.

4.5 – Ensaio de liberação de lactato desidrogenase

Os BMDMs dos grupos C57BL/6, Gal-3 KO e GBPchr3 KO foram plaqueados em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e infectados com *B. abortus* (MOI 100). As infecções foram realizadas em meio DMEM sem vermelho de fenol (phenol-red). Após 8 h de infecção, os sobrenadantes foram coletados para análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pelas células mortas. (Cerqueira et al., 2018). A quantidade de LDH total foi determinada a partir da lise das culturas controle com Triton X-100. A presença da enzima LDH foi quantificada utilizando o kit de liberação de LDH CytoTox 96 (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Ensaio de produção de óxido nítrico

Para avaliar a produção de óxido nítrico (NO), esplenócitos de animais C57BL/6 e Gal-3 KO foram infectados com *B. abortus* (MOI 100), ou tratados com 1 mg/mL de LPS de *Escherichia coli* em um volume total de 200 μ L de meio/poço e foram testados quanto ao acúmulo do produto final estável de NO, nitrito (NO₂), usando o reagente de Griess conforme descrito anteriormente (Campos et al., 2019). Resumidamente, os sobrenadantes da cultura (50 μ L) foram misturados com 50 μ L do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dicloridrato de naftiletilina diamina e 2,5% de ácido fosfórico). Posteriormente, a mistura foi incubada protegida da luz em temperatura ambiente por 5 min e a absorbância a 550 nm foi medida em leitor de microplacas. Meio de cultura fresco (DMEM + 1% SFB) foi usado como um branco em todos os experimentos. A concentração de NO₂ foi determinada por comparação com uma curva padrão de nitrito de sódio, NaNO₂, (Sigma).

4.7 Preparo do inóculo de *Brucella abortus* e determinação da replicação bacteriana

A cepa S2308 da *B. abortus* foi crescida em meio *Brucella Broth* líquido (BB) (DIFCO), a 37 °C, sob agitação constante. Após três dias de crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada e o sedimento ressuscitado em tampão salina fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,4 (2,8 mM Na₂PO₄; 7,2 mM Na₂HPO₄; 0,14 M NaCl). Alíquotas destas culturas foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio BB solidificado com 1,5% de ágar bacteriológico para titulação.

Cinco camundongos de cada grupo (C57BL/6 e Gal 3^{-/-}) foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com uma solução de 100 µL de salina 0,9% NaCl contendo 1x10⁶ UFCs de *B. abortus* da cepa virulenta S2308 e sacrificados em câmara de CO₂ após 1, 2 e 3 semanas de infecção. Para medir a multiplicação intracelular em macrófagos, os BMDMs foram semeados em placas de 24 poços na densidade de 5x10⁵ células por poço. As culturas foram infectadas em *B. abortus* (MOI 100) por 2, 6, 12 e 24 horas, seguido por incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂

4.7.1 Determinação do número de unidades formadoras de colônias *in vitro* e *in vivo*

Os macrófagos infectados com *B. abortus* foram lavados duas vezes com PBS e para determinação de CFU, as culturas foram lisadas em água estéril após 2 e 24 horas de infecção. Quando indicado, as células foram tratadas 24 h antes da infecção com 100 U/ml de um IFN-β recombinante de camundongo (Millipore, Burlington, MA). Os lisados de cada poço foram diluídos em água, semeados em placas de ágar de caldo *Brucella* (BB) e incubados por 3 dias a 37°C antes da contagem de CFU.

Os baços extraídos dos animais foram pesados e posteriormente macerados em 9 mL de solução salina (NaCl a 0,9%), com o auxílio de uma peneira de aço e diluídos serialmente. As diluições feitas a partir do homogenato, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 10⁻⁵ foram plaqueadas em duplicada em meio sólido *Brucella Broth*. Após 3 dias de incubação a 37°C, o número de UFCs foi determinado como descrito anteriormente (Macedo et al., 2008). Os resultados foram expressos como log de UFC/g do baço dos animais.

4.7.2 – Análise da produção de citocinas por esplenócitos

Para análise dos níveis de produção de IFN- γ , TNF- α , IL-12 e CXCL10 por esplenócitos, o homogenato de células resultante do macerado dos baços foi tratada com tampão de lise ACK (10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl, pH 7.2 em água destilada) por 5 minutos, seguido de lavagens com solução salina 0,9% NaCl para eliminar hemácias e outras impurezas. Em seguida as células foram contadas e plaqueadas na concentração de 10⁶ células/poço em placas de 96 poços com fundo em “U”. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor e 1% de penicilina e estreptomicina.

As células foram estimuladas com *B. abortus* selvagem (MOI 100), concanavalina A (ConA) (5 μ g/ml) ou LPS (1 μ g/mL). Após 12, 48 ou 72 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados para análise da produção de citocinas.

4.8 Ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos no baço. Sumariamente, cinco camundongos de cada grupo, C57BL/6 e Gal-3^{-/-} foram infectados com 1x10⁶ UFC de *B. abortus* e sacrificados 2 semanas após a infecção. Fragmentos com aproximadamente 100 mg dos baços obtidos dos animais foram removidos e congelados a -80°C. Após o descongelamento, o tecido foi homogeneizado em 1,0 mL de tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA) utilizando o homogeneizador de tecidos (T10 básico ULTRA-TURRAX, IKA, Alemanha). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 μ L de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento a -80 °C e

descongelamento. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando Tetramethylbenzidine (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Multiskan FC Thermo Scientific, EUA).

4.9– Western blot

Os BMDMs selvagens, Gal-3 KO e GBPchr3 KO foram cultivados em placas de 24 poços (5x10⁵ células/poço), infectados com *B. abortus* cepa S2308 ou $\Delta virB$ (MOI 100) e mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Após 2, 6 e 24 horas de infecção, os sobrenadantes da cultura foram coletados e as células foram lisadas utilizando o Reagente de Extração de Proteínas de Mamífero M-PER (Thermo Fisher Scientific) suplementado com uma mistura de inibidores de protease na concentração 1:100 (Sigma-Aldrich) e congelados a -80° C.

Aos sobrenadantes e lisados coletados foi adicionado tampão de amostra de Laemmli (Laemmli, 1970) e o conteúdo foi fervido por 10 minutos. Para separação das proteínas, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida a 15% e as proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose à 25V por 22 minutos em um sistema *semi-dry* de transferência (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System – BIORAD). O bloqueio foi realizado por 1 hora sob agitação branda em tampão de bloqueio (TBS + 5% leite desnatado + 0,1% Tween20). Às membranas correspondentes ao sobrenadante foi adicionado o anticorpo primário anti-galectina 3 (ThermoFisher Scientific) ou caspase-1 (Adipogen) em tampão de bloqueio (TBS + 1% leite desnatado + 0,1% Tween20) na concentração de 1:1000. Às membranas correspondentes aos lisados, foram adicionados os anticorpos anti- β -actina, STAT-1, STAT-1 fosforilado na tirosina 701, pró-IL-1 β , (Cell Signaling Technology) GBP5, GBP2 (Proteintech®), Pro-caspase-1 (Adipogen) em tampão BSA (TBS + BSA 5% + 0,1% Tween20), em todos os casos na concentração 1:1000. A incubação foi realizada por 16 horas sob agitação a 4°C. A membrana foi novamente lavada 3 vezes durante 5 min utilizando TBS com 0,1% de Tween 20 e seguida por incubação por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (KPL) na concentração de 1:1000 em tampão de bloqueio (TBS +

1% leite desnatado + 0,1% Tween20). As bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o substrato de HRP quimioluminescente luminol (Millipore) e analisadas utilizando o software ImageQuant TL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

4.10 Microscopia confocal

BMDMs de camundongos C57BL/6 e Gal-3 KO foram plaqueados (1×10^5 cél/poço) em lamínulas de vidro e deixados para aderir por 24h. Os macrófagos foram infectados por 2 e 24h com *B. abortus-GFP*⁺ (MOI 20). Para realização da imunofluorescência, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 4% paraformaldeído (pH 7,4) por 30 min e permeabilizados com 0.5% Triton (Sigma-Aldrich) X100 por 15 minutos. Os BMDMs foram tratados com solução de bloqueio 1% BSA por 1 hora e incubadas a 4° C com anticorpos primários anti-Galectina-3 (no.A3A12; ThermoFisher Scientific) e anti-GBP2 (no.11854-1 AP; Proteintech®) por 12 horas. As células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário (1:500) goat anti-mouse ou anti-rabbit, conjugado com Alexa fluor 546, por 1h à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e as lâminas montadas com ProLong Gold antifade (Invitrogen) e DAPI para marcação nuclear. A análise de microscopia confocal foi realizada em um sistema confocal Nikon A1. Pelo menos três lamínulas foram analisadas por amostra e imagens representativas foram tiradas usando uma objetiva x40. A intensidade média de fluorescência (MFI) foi quantificada por célula inteira e reflete a intensidade média de fluorescência pela área celular e foi avaliada usando o software ImageJ.

4.11 Microscopia eletrônica de transmissão

BMDMs de camundongos C57BL/6 e Gal-3 KO (1×10^7) foram semeados como descrito anteriormente e infectados com *B. abortus* (MOI de 100) por 6 h. Após infecção, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato (1 M), fixadas com glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 1 M) por 24 h a 4 ° C e depois lavadas novamente três vezes com tampão fosfato (1 M). As amostras foram encaminhadas ao Centro de Microscopia da UFMG para

desidratação, tratamento com tetróxido de ósmio e acetato de uranila e análise por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para avaliar a porcentagem de membranas de vacúolo contendo *Brucella* (BCV), rompidas avaliamos 30 macrófagos por grupo. Cada macrófago foi avaliado em relação ao número total de bactérias em aumento de 14.500 x. Em seguida, a integridade da membrana de cada BCV foi avaliada cuidadosamente em um aumento maior (x60.000). Após a análise, calculamos a porcentagem de BCVs rompidos em relação ao número total de bactérias contadas.

4.12 Análise da expressão diferencial de genes por PCR em tempo real

4.12.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para análise da expressão diferencial dos genes, o RNA das amostras provenientes das culturas celulares estimuladas com *B. abortus* foram extraídas utilizando o reagente LS Trizol® (Life Technologies, USA) seguindo as instruções do fabricante. As amostras com Trizol foram homogeneizadas e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se então 200 uL de clorofórmio, homogeneizou-se, e as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 46 1200 g. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um tubo estéril. O RNA total foi precipitado com 200 uL de isopropanol por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado, e o precipitado lavado com etanol 75%. Por fim, o RNA total foi eluído com 25 uL de água livre de RNase. Após a extração, o RNA total foi quantificado em Nanodrop (ThermoScientific, USA) a 260 nm e armazenado a -80°C até ser utilizado para a síntese do cDNA de fita simples. A transcrição reversa de 2 µg do RNA total foi realizada usando as microesferas de RT-PCR Illustra Ready-To-Go (GE Healthcare, Chicago, IL) de acordo com as instruções do fabricante.

4.12.2 PCR em tempo real

Para análise da expressão diferencial dos genes codificadores de Galectina-3, IFN- β , GBP2, GBP3, GBP4, GBP5, 18S e β -actina os iniciadores foram desenhados utilizando dados da literatura ou através do software RTPrimerDB. Os iniciadores utilizados e suas sequências estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR em tempo real

Primer	Sequência
<i>Galectina 3 F</i>	5'-CAGGAAAATGGCAGACAGCTT-3'
<i>Galectina 3 R</i>	5'-CCCATGCACCCGGATATC-3'
<i>IFN-β F</i>	5'-AGCACTTTGGGTGACCACCAGGA-3'
<i>IFN-β R</i>	5'-AGCTAAGTATTAGAGCGGCGGCA-3'
<i>18S F</i>	5'-TGACATCAACACTCCCCTGACAAC-3'
<i>18S R</i>	5'-GCCTTTTCTTCCTTCCCAGCAG-3'
<i>GBP2 F</i>	5'-CTGCACTATGTGACGGAGCTA-3'
<i>GBP2 R</i>	5'-5'CGGAATCGTCTACCCCACTC-3'
<i>GBP3 F</i>	5'-CTGACAGTAAATCTGGAAGCCAT-3'
<i>GBP3 R</i>	5'-CCGTCCTGCAAGACGATTCA-3'
<i>GBP4 F</i>	5'-GGAGAAGCTAACGAAGGAACAA-3'
<i>GBP4 R</i>	5'-TTCCACAAGGGAATCACCATTTT-3'
<i>GBP5 F</i>	5'-CTGAACTCAGATTTTGTGCAGGA-3'
<i>GBP5 R</i>	5'-CATCGACATAAGTCAGCACCAG3-'
<i>β – actina F</i>	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG3-'
<i>β – actina R</i>	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3-'

Fonte: Do autor

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento QuantStudio3 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume final das reações foi de 10 uL contendo 5 µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM de cada oligonucleotídeo e 3 uL do cDNA de cada amostra. As condições de amplificação utilizadas para a análise dos genes consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. As reações que compreendem a faixa de 95%- 105% de eficiência foram utilizadas e aceitas para as análises posteriores. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O controle endógeno utilizado foi a β -actina para ensaios *in vitro* e 18S para ensaios *in vivo*. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação.

4.13 Análise de citometria de fluxo

Cinco camundongos de cada grupo (C57BL/6 e Gal-3 KO) foram infectados i.p com 1×10^6 UFCs de *B. abortus*. Para análise de citometria de fluxo, além dos animais infectados, utilizamos também cinco animais não infectados para cada um dos grupos. Os animais foram sacrificados 2 semanas após a infecção. As células do baço foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS estéril. Após a lavagem, as células foram ajustadas para 1×10^6 células em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 150 U de penicilina e 150 µg de sulfato de estreptomicina por poço numa placa de 96 poços. Também foram utilizadas células para o controle negativo (células não marcadas) e para os dois controles FMO. As células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 7 min a 4°C e lavadas com PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (PBS/BSA). Depois, as células foram incubadas com anti-CD16/CD32 (FcBlock) (1:30 diluído em PBS/BSA) durante 20 min a 4°C. As células foram depois centrifugadas e lavadas em PBS/BSA e incubadas durante 20 min a 4°C com uma mistura dos seguintes anticorpos: anti-CD11b conjugado a APC-Cy7 (1:200, M1/70), anticorpos anti-CD11c conjugado a FITC (1:100, HL3), anticorpos anti-F4/80 biotinilados (1:200, BM8) e anticorpos anti-Ly6G conjugado a PE (1:200, 1A8) diluídos em ADS.

Nos controles FMO foram incubados os mesmos anticorpos diluídos em ADS, entretando, um desses controles não apresentavam o anticorpo anti-CD11c conjugado a FITC

e no outro controle não apresentavam o anticorpo anti-Ly6G conjugado a PE. Nas células não marcadas foram adicionados 30µL de ADS. As células foram então incubadas por 20 minutos a 4°C com estreptavidina conjugada a APC (1:200) diluída em ADS. Por fim, as células foram lavadas três vezes e mm seguida, foram adicionados 200µL de PBS para ressuspender as células. A análise de quantificação das células foi realizada no AttuneÒ Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems). Os dados gerados pelo citômetro foram analisados utilizando o programa Flowjo 10 (Tree Star, Inc., Oregon, USA).

4.14 – Análise estatística

Para realização das análises estatísticas, utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.0, e foi empregado o teste t de *Student* não-pareado para comparar os dados entre os grupos experimentais. Nos experimentos de curvas de crescimento *in vitro*, os dados foram analisados por *two-way* ANOVA seguido de análise pós-teste Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados cujas diferenças apresentaram $p < 0,05$.

5 – RESULTADOS

5.1 A infecção por *B. abortus* induz a expressão de Galectina-3

Após sua síntese, a Galectina-3 é armazenada no citoplasma, local onde exerce diferentes funções. Em resposta a estímulos como por exemplo, dano tecidual ou infecção por diferentes patógenos, a Gal-3 pode ser secretada por células ativadas. No entanto, o papel dessa lectina durante a infecção por *B. abortus* ainda era desconhecido. Dessa forma, decidimos investigar se a infecção por *Brucella* induzia a expressão de Gal-3. Para responder a essa questão, infectamos macrófagos da linhagem C57BL/6 (selvagens) com *B. abortus* por 2, 6 e 24 horas. Após os tempos de infecção, o sobrenadante das células foi coletado e o lisado devidamente preparado para ser submetido às técnicas de qPCR e Western Blotting. Observamos que os macrófagos infectados com *B. abortus* aumentaram os níveis de expressão (Fig. 8 A) e secreção (Fig 8 B) de Gal-3 em comparação com macrófagos não infectados.

Estudos anteriores demonstraram que membros da família das galectinas são capazes de se ligar diretamente a microorganismos e de se associarem a vacúolos contendo patógenos. Sendo assim, nós nos perguntamos se a Gal-3 era capaz de se associar ao vacúolo contendo *Brucella*. Para testar essa hipótese, nós infectamos macrófagos com *B. abortus* por 2 e 24 horas e monitoramos através de microscopia confocal, a localização subcelular de Gal-3. Como esperado, as análises de microscopia confocal confirmaram uma intensidade de fluorescência de baixo nível basal de Gal-3 em macrófagos não infectados e, aumento de intensidade de fluorescência e aparentemente maior co-localização de Gal-3 com vacúolos de *B. abortus* (Fig. 8 C-D).

Bactérias vacuolares como *B. abortus*, utilizam sistemas de secreção para liberar proteínas efetoras do citoplasma bacteriano para o citosol da célula hospedeira. Dessa forma, infectamos macrófagos com *B. abortus* mutante *virB*, a fim de avaliar a importância do sistema de secreção tipo IV para a indução de Gal-3. Quando macrófagos foram infectados com *B. abortus* mutante em *ΔvirB* foi observada uma redução na expressão (Fig 8 E) e secreção (Figura 8 F) de Gal-3 em relação aos infectados com bactérias selvagens.

Em conjunto, esses dados demonstraram que a infecção por *B. abortus* é capaz de modular a expressão e o recrutamento da Galectina-3 de maneira parcialmente dependente do sistema de secreção tipo IV *virB*.

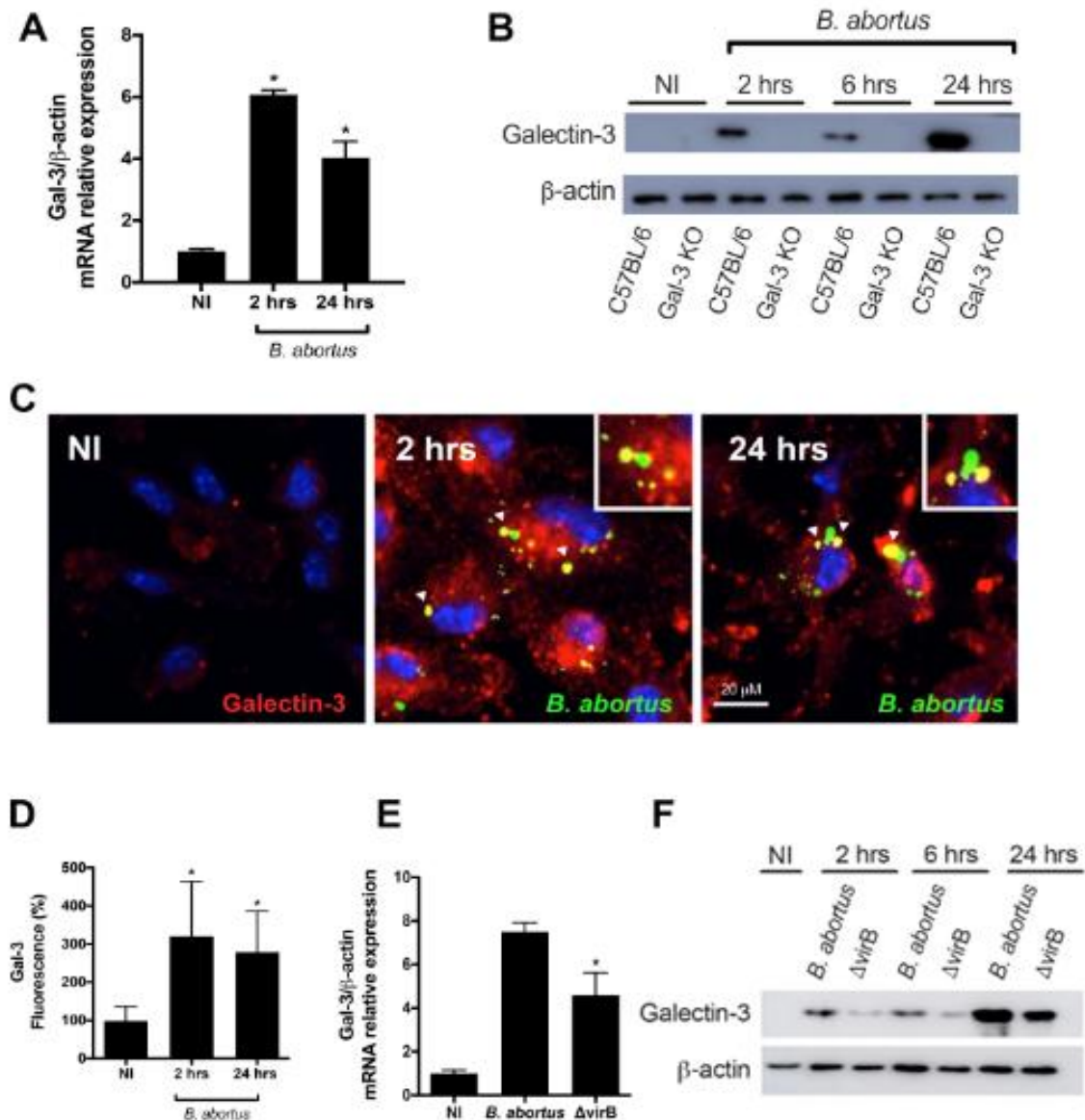


Figura 8: A infecção por *B. abortus* induz a expressão de Galectina-3. Macrófagos foram obtidos de camundongos C57BL/6 e permaneceram não infectados (NI) ou infectados com *B. abortus* (MOI 100:1). Após 2 e 24 horas, o RNA total foi extraído e a qPCR foi realizada para medir a expressão do gene Galectina-3. (A). Os

sobrenadantes de cultura e lisados de BMDMs das linhagens C57BL/6 e Gal-3 KO foram colhidos e 2, 6 e 24 horas após a infecção, a secreção de Gal-3 foi observada por Western blot. A β -actina foi quantificada nos lisados celulares correspondentes como controle da quantidade de proteína aplicada. (B). BMDMs obtidos de camundongos C57BL/6 foram infectados com *B. abortus* – GFP (MOI 20:1) por 2 e 24 horas e processados para análise de microscopia de fluorescência. As bactérias que expressam GFP são mostradas em verde, a expressão de Galectina 3 em vermelho e DAPI (DNA) em azul, Barra de escala, 20 μ M. (C). Análise do MFI (mediana da intensidade de fluorescência) de Gal-3 em macrófagos selvagens NI e infectados com *B. abortus* (D) Macrófagos de camundongos C57BL/6 permaneceram não infectados (NI), infectados com *B. abortus* WT ou com o mutante do sistema de secreção de *Brucella* tipo IV (Δ virB) e a expressão e produção de Gal-3 avaliada por qPCR (E) 24 horas após a infecção e por Western blot. A β -actina foi quantificada nos lisados celulares correspondentes como controle da quantidade de proteína aplicada (D), 2,6 e 24 horas após infecção. Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado a NI, ANOVA unilateral

5.2 A Galectina-3 é necessária para as respostas de IFN do tipo I induzidas em resposta a *B. abortus*

Diversos estudos já descreveram papéis das proteínas pertencentes a família das galectinas durante processos inflamatórios (Ortega et al.,2017). Como observamos que a infecção por *B. abortus* induz a expressão e secreção de Gal-3 em macrófagos, decidimos avaliar o papel da Gal-3 produzida durante a infecção. Para isso, macrófagos das linhagens C57BL/6 (selvagens) e Gal-3 KO (deficiente para o gene que codifica a proteína Galectina-3) permaneceram não infectados ou foram infectados com *B. abortus* por 24 horas para avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a essa bactéria. Observamos a partir das técnicas de qPCR e ELISA que macrófagos Gal-3 KO produziram menores quantidades de IFN- β (Fig 9 A) e CXCL-10 (Fig 9 B) em comparação com macrófagos selvagens após 24 horas de infecção. Já na secreção de TNF- α , uma citocina independente de INF do tipo I, não houve diferença na produção nas células Gal-3 KO e selvagens infectadas (Fig 9 C). Como esperado, as células não infectadas não produziram quantidades significantes de IFN- β , CXCL-10 e TNF- α (Fig 9 A-C).

As famílias de receptores de IFNs utilizam vias de transdução de sinais que envolvem proteínas JAKs-STATs. Uma vez produzidos, os IFNs do tipo I podem sinalizar levando a ativação dessas vias. Visto que macrófagos deficientes em Gal-3 apresentaram diminuição na produção de citocinas relacionadas ao IFN do tipo I, nós decidimos avaliar por Western Blotting se a Galectina-3 exercia algum papel durante a fosforilação de STAT-1. Para isso, macrófagos selvagens e Gal-3 KO permaneceram não infectados ou foram infectados com *B. abortus* por 2, 6 e 24 horas. Após os tempos de infecção, os lisados celulares foram

preparados para Western Blotting utilizando anticorpos específicos para STAT 1 e STAT 1 fosforilado na tirosina 701. Como esperado, concomitante a diminuição da produção de IFN- β e CXCL10, macrófagos Gal-3 KO infectados com *B. abortus* por 24 horas apresentaram uma menor fosforilação de STAT-1 em comparação com macrófagos selvagens (Fig 9 D). Coletivamente, esses resultados sugerem que Galectina-3 desempenha um papel imunomodulador na indução de respostas de IFN tipo I durante a infecção por *B. abortus*.

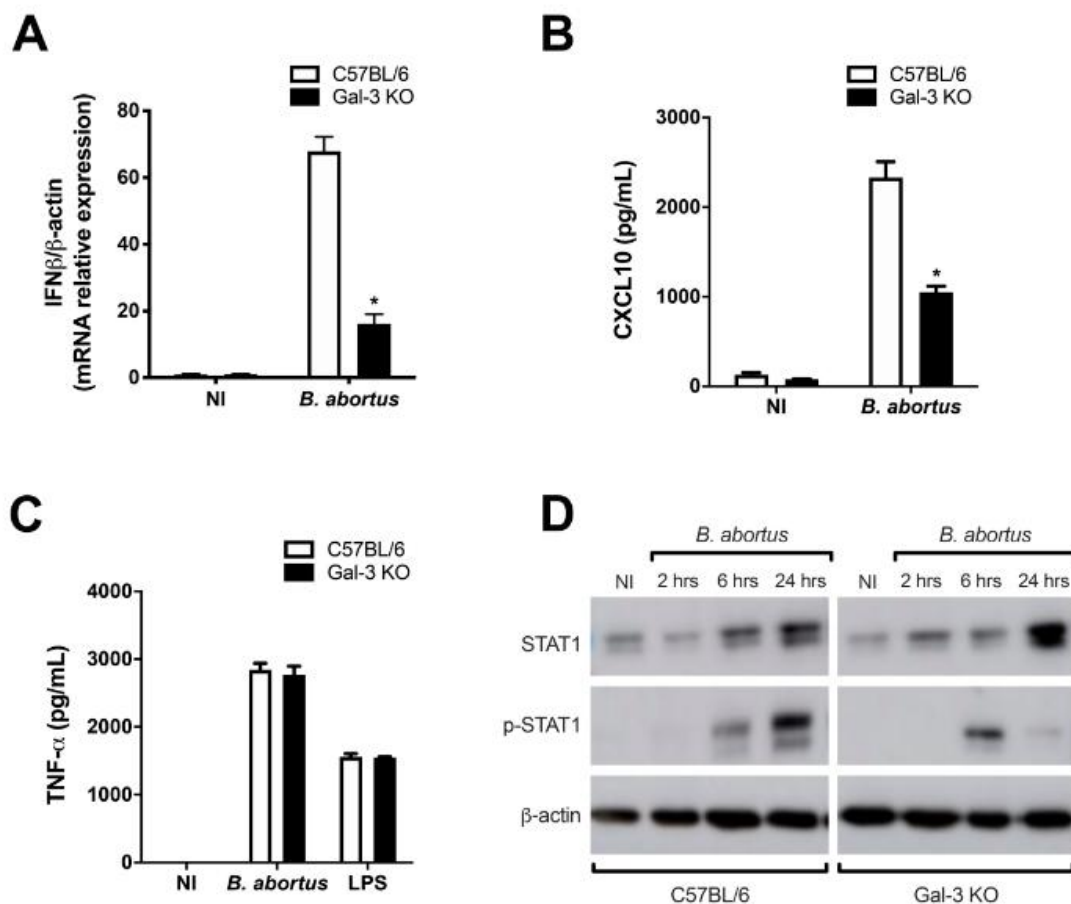


Figura 9: A Galectina-3 é necessária para as respostas de IFN do tipo I induzidas em resposta a *B. abortus*. Macrófagos de camundongos WT e Gal-3 KO permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados com *B. abortus* (MOI 100:1). Análises de qPCR foram realizadas para determinar a expressão de IFN- β 24 horas após a infecção (A). Os sobrenadantes celulares foram colhidos 24 horas após a infecção para determinar a produção de CXCL10 (B) e TNF- α (C) por ELISA. Os lisados celulares foram colhidos 2, 6 e 24 horas após a infecção, e a expressão de STAT1 e p-STAT1-Tyr 701 foi determinada por Western Blot. A β -actina foi quantificada nos lisados celulares correspondentes como controle da quantidade de proteína aplicada (D). Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação com camundongos do tipo selvagem, two-way ANOVA.

5.3 A Galectina-3 influencia a expressão das GBPs mas não é necessária para o rompimento do vacúolo de *B. abortus*

Vários programas de defesa celular intrínseco do hospedeiro são ativados por citocinas e IFNs. Sabe-se que os IFNs induzem de forma robusta a expressão de fatores de resistência do hospedeiro, incluindo GBPs. As GBPs são GTPases que podem atuar na ruptura das membranas de patógenos vacuolares (Feeley et al., 2017). Recentemente nosso grupo demonstrou que a sinalização de IFN do tipo I é necessária para a expressão de GBPs em macrófagos infectados por *B. abortus* e que estas moléculas estão envolvidas no controle da infecção (Costa Franco et al., 2017). Portanto, neste trabalho, hipotetizamos que a redução de IFN- β em macrófagos Gal-3 KO (Fig 9 A), poderia afetar a expressão de GBPs nessas células. Para elucidar essa hipótese, avaliamos a expressão de GBPs em macrófagos selvagens e Gal-3 KO em resposta a *B. abortus*. Para isso, as células foram infectadas por *B. abortus* e após 24 horas, os lisados celulares foram devidamente preparados para análises de qPCR e Western Blotting. Como esperado, observamos redução da expressão dos GBPs 2, 3, 4 e 5 em macrófagos Gal-3 KO (Fig 10 A), e diminuição dos níveis de proteínas de GBP2 e GBP5 em células Gal-3 KO (Fig 10 B) quando comparados com macrófagos selvagens. Além disso, infectamos macrófagos Gal-3 KO e selvagens com *B. abortus* por 24 horas e posteriormente realizamos análises de microscopia confocal que confirmaram uma menor intensidade de fluorescência de GBP2 em macrófagos Gal-3 KO em comparação com macrófagos selvagens (Fig 10 C e D). Esses dados sugerem que a indução de Galectina-3 em macrófagos infectados por *B. abortus* pode estar relacionada à produção de GBPs associadas à via de IFN tipo I.

Os GBPs são importantes para promover imunidade celular contra patógenos intracelulares que residem dentro de vacúolos. Os mecanismos pelos quais estas moléculas detectam e se ligam a vacúolos ainda não é totalmente elucidado, porém, foi demonstrado que a Galectina-3 apresenta um papel funcional na entrega de GBP2 para vacúolos de patógenos (Feeley et al., 2017). Além disso, nosso grupo recentemente demonstrou que a maquinaria dos GBPs é importante para o rompimento do vacúolo contendo *Brucella* (Costa Franco et al., 2017). Dada a interação já descrita entre a Gal-3 e o GBP2 e a importância dos GBPs no rompimento do vacúolo de *B. abortus*, nós decidimos avaliar se a Galectina-3 era necessária para desencadear o rompimento do BCV. Para responder a essa questão, nós infectamos

macrófagos selvagens e Gal-3 KO com *B. abortus* por 6 horas e posteriormente, analisamos por microscopia eletrônica de transmissão a porcentagem de vacúolos de *Brucella* rompidos nos dois grupos celulares. Dessa forma, nós observamos que 47,5% do BCV foi rompido em macrófagos selvagens quando comparado com 47% em macrófagos Gal-3 KO (Fig. 10 E e F) demonstrando que a Galectina- 3 não está envolvida diretamente no rompimento do BCV.

Em resumo, esses dados sugerem que a Galectina-3 está envolvida na regulação da expressão de GBPs, mas não é necessária para o rompimento do BCV durante a infecção por *B. abortus*.

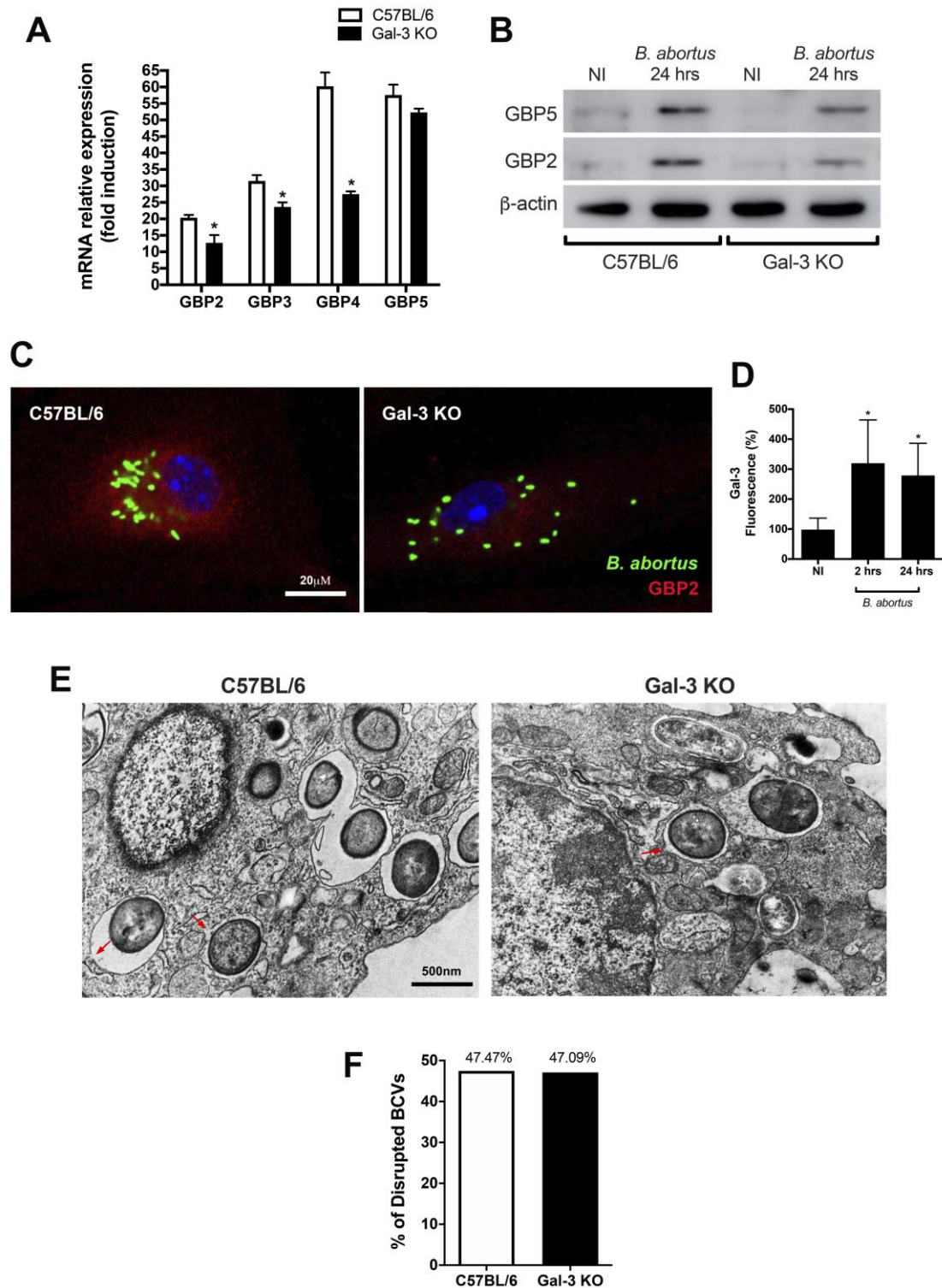


Figura 10: A Galectina-3 influencia a expressão das GBPs mas não é necessária para o rompimento do vacúolo de *B. abortus*. Macrófagos obtidos de camundongos C57BL /6 e Gal-3 KO permaneceram não

infectados (NI) ou foram infectados com *B. abortus* (MOI 100:1). O RNA total foi extraído e o qPCR foi realizado para medir a expressão dos genes GBP2, GBP3, GBP4 e GBP5 24 horas após a infecção (A). Os lisados celulares foram colhidos 24 horas após a infecção, e a produção de GBP2 e GBP5 determinada por western blot. A β -actina foi quantificada nos lisados celulares correspondentes como controle da quantidade de proteína aplicada (B). Macrófagos obtidos de camundongos C57BL / 6 e Gal-3 KO foram infectados com *B. abortus* – GFP (MOI 20: 1) por 24 horas e processados para análise de microscopia de fluorescência. As imagens são representativas de todos os experimentos analisados. As bactérias que expressam GFP são mostradas em verde, a expressão de GBP2 em vermelho e DAPI (DNA) em azul (C). Análise do MFI (mediana da intensidade de fluorescência) de GBP2 em células obtidas de camundongos C57BL / 6 e Gal-3 KO infectados com *B. abortus* (D). Macrófagos de camundongos C57BL/6 e Gal-3KO foram infectados com *B. abortus* por 6 horas e a integridade das membranas de BCV foi avaliada por TEM. (E) As setas vermelhas indicam regiões de ruptura da membrana do BCV. A porcentagem de membranas de BCV rompidas foi avaliada e está representada no gráfico (F). Barra de escala, 500 nm. B: *B. abortus*. Os dados são representativos de três experimentos independentes * $p < 0,05$ em comparação com camundongos do tipo selvagem, two-way ANOVA.

5.4 A Galectina-3 não influencia a ativação do inflamassoma durante a infecção por *B. abortus*

Como observamos que os macrófagos Gal-3 KO expressam menor quantidade de GBPs (Fig 10 A-D) e que estas moléculas estão envolvidas diretamente na ativação do inflamassoma frente a infecção por *B. abortus* (Cerqueira et al., 2018), decidimos investigar se a ativação do inflamassoma requeria a participação de Gal-3. Para isso, macrófagos murinos foram isolados de camundongos selvagens, Gal-3 KO e GBPchr3 KO e infectados com *B. abortus*. Posteriormente, o sobrenadante e os lisados celulares foram devidamente preparados para avaliação da secreção de IL-1 β e ativação de caspase-1 por ELISA e WB. Como controle, os macrófagos foram tratados com nigericina, a qual atua como agonista canônico de NLRP3. Após 50 min de tratamento com nigericina e 24 horas de infecção com *B. abortus*, a produção de IL-1 β e a ativação de caspase-1 foi avaliada. Observamos que macrófagos selvagens e Gal-3 KO secretaram níveis semelhantes de IL-1 β em resposta à infecção por *B. abortus* enquanto que, como esperado, as células deficientes em GBPchr3 mostraram níveis reduzidos de IL-1 β em comparação com macrófagos selvagens (Figura 11 A). O tratamento com nigericina comprovou a capacidade dos macrófagos de todas as linhagens utilizadas no experimento em responder adequadamente a um estímulo cuja resposta já é conhecida. Além disso, observamos que macrófagos deficientes em Gal 3 mostraram níveis de ativação de caspase-1 semelhantes aos macrófagos selvagens. No entanto, macrófagos deficientes em GBPchr3 apresentaram um processamento menor de caspase-1 (Fig 11 B).

Como já demonstrado pelo nosso grupo, a *B. abortus* é capaz de desencadear piroptose em macrófagos (Cerqueira et al., 2018). Dessa forma, a fim de avaliar o papel da Galectina-3 durante a piroptose desencadeada por *Brucella*, nós quantificamos a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes da cultura celular. Para isso, macrófagos murinos foram isolados de camundongos C57BL/6, Gal-3 KO e GBPchr3 KO e infectados com *B. abortus* por 8 horas e a LDH foi quantificada nos sobrenadantes. Observamos que *B. abortus* desencadeou uma porcentagem equivalente de liberação de LDH em macrófagos selvagens e Gal3 KO, no entanto, macrófagos da linhagem GBPchr3 KO apresentaram menor porcentagem de liberação de LDH, confirmando a importância destas moléculas na piroptose em resposta a *Brucella*. (Figura 11 C).

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que na infecção por *B. abortus*, a Galectina-3 é dispensável para ativação do inflamassoma e para a piroptose.

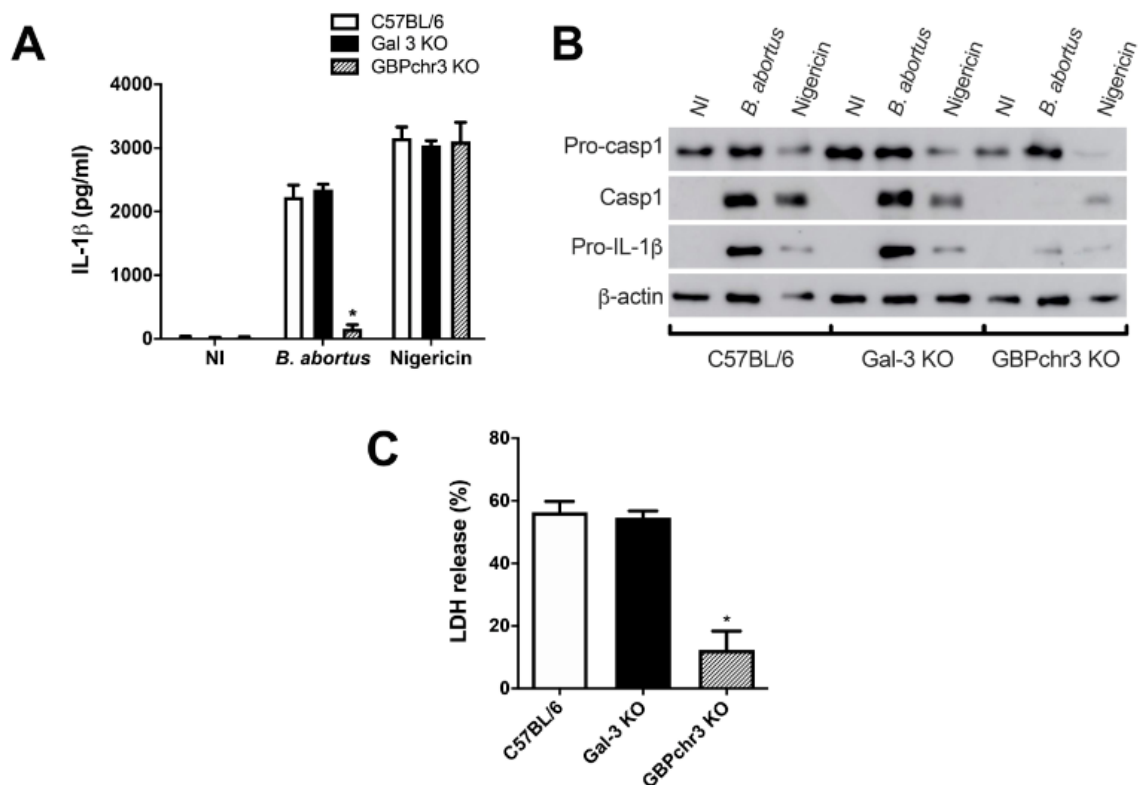


Figura 11: A Galectina-3 não influencia a ativação do inflamassoma durante a infecção por *B. abortus*. Macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6, Gal-3 KO e GBPchr3 KO permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados com *B. abortus* por 24 horas (MOI 100:1). Os sobrenadantes foram submetidos ao ELISA para estimar a concentração de IL-1β (A). Os mesmos sobrenadantes e lisados das culturas foram colhidos 24 horas após a infecção, e a quantidade de Pro-casp1, Casp1 e Pró-IL-1 β foi determinada por western blot. A β-actina foi quantificada nos lisados celulares correspondentes como controle da quantidade de proteína aplicada

(B). Macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6, Gal-3 KO e GBPchr3 foram infectados com *B. abortus* e a morte celular foi determinada medindo a liberação de LDH no sobrenadante 8 horas após a infecção (C). Os dados são representativos de três experimentos independentes * $p < 0,05$ em comparação com camundongos do tipo selvagem, two-way ANOVA.

5.5 A Galectina-3 é necessária para a replicação eficiente de *B. abortus* em macrófagos

Até aqui, nossos dados mostram que, apesar de não influenciar diretamente no rompimento do BCV e na ativação do inflamassoma (Figuras 10 e 11), a Gal-3 parece estar envolvida com respostas de IFN do tipo I durante a infecção por *B. abortus*. Sendo assim, nós nos perguntamos se a Galectina-3 influenciava a replicação de *B. abortus* em macrófagos. Para responder á esta questão, isolamos macrófagos murinos de animais selvagens e Gal-3 KO e infectamos com *B. abortus* (MOI: 100). Após 2, 6, 12 e 24 horas de infecção, os macrófagos foram lisados e as contagens de CFUs bacterianas foram analisadas. Como mostrado na figura 12 A, nenhuma diferença nas contagens bacterianas foi observada em 2 e 6 horas após a infecção, sugerindo que a ausência de Gal-3 não afeta a entrada de *B. abortus* em macrófagos no estágio inicial da colonização. Entretanto observamos que, 12 e 24 horas após a infecção, a carga bacteriana foi reduzida em macrófagos deficientes em Gal-3 em comparação aos macrófagos selvagens. Esse resultado sugere que a Galectina-3 favorece a replicação bacteriana em macrófagos infectados com *B. abortus*.

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a sinalização de IFN do tipo I induzida por *B. abortus* é prejudicial ao controle da infecção pelo hospedeiro, uma vez que foram encontrados menores UFCs bacterianas em camundongos IFN- $\alpha\beta$ R KO quando comparados com camundongos WT (Almeida et al., 2011). Assim, nós hipotetizamos que a Galectina-3 poderia favorecer a replicação de *B. abortus* através da indução de IFN- β . Para responder essa hipótese, isolamos macrófagos murinos de animais selvagens e Gal-3 KO e primamos as células com rIFN β por 24 horas. Posteriormente, infectamos os macrófagos tratados com rIFN β com *B. abortus* por 2, 6, 12 e 24 horas. Dessa forma, observamos que macrófagos Gal3 KO primados com rIFN β aumentaram a carga bacteriana em comparação com macrófagos selvagens primados com rIFN β (Figura 12 B). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a Galectina 3 favorece a sobrevivência de *B. abortus* em BMDMs através da indução de respostas de IFN do tipo I.

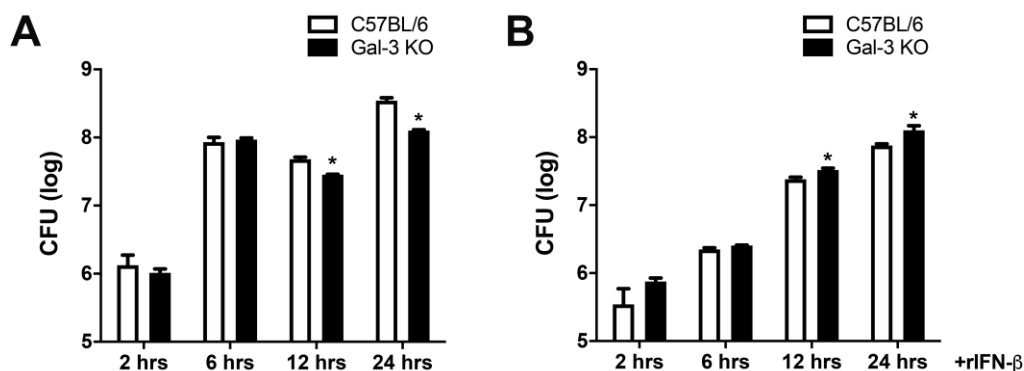


Figura 12: A Galectina-3 é necessária para a replicação eficiente de *B. abortus* em macrófagos. Macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6 e Gal-3 KO foram infectados por 2, 6, 12 e 24 horas com *B. abortus*. As células foram lisadas 2, 6, 12 e 24 horas após a infecção e as contagens de CFU bacterianas foram analisadas (A). Quando indicado, as células foram tratadas 24 horas antes da infecção com 100 U / ml de rIFN- β de camundongo. Os macrófagos foram lisados 2, 6, 12 e 24 horas após a infecção e as contagens de CFU bacterianas foram analisadas (B). Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação com camundongos do tipo selvagem, two-way ANOVA.

5.6 A deficiência de Gal-3 aumenta a proteção do hospedeiro contra a infecção por *B. abortus*

Visto que a infecção por *B. abortus* modula a expressão de Gal-3 em macrófagos, nós nos perguntamos se a *Brucella* também era capaz de induzir a expressão de Gal-3 *in vivo*. Para responder a essa pergunta, camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados intraperitonealmente por 2 semanas com 10^6 UFCs bacterianas e realizamos análise de qPCR no homogenato de baço. Como observado na figura 13 A, a Galectina-3 é altamente expressa no baço de camundongos durante a infecção por *B. abortus* quando comparado com o baço de animais não infectados.

Uma vez que *B. abortus* induziu a expressão de Gal-3 em macrófagos e no baço dos animais, nós investigamos o papel da Gal-3 no controle da infecção por *B. abortus* em camundongos. Para isso, camundongos das linhagens Gal-3 KO e C57BL/6 foram infectados intraperitonealmente com 10^6 UFCs bacterianas. Após 1, 2 e 3 semanas de infecção, as UFCs foram determinadas a partir do homogenato do baço. Como observado, a recuperação da carga bacteriana foi menor nos camundongos Gal 3 KO em comparação ao grupo selvagem

em 1, 2 e 3 semanas após a infecção por *B. abortus* (Fig 13 B). Esse resultado demonstra que a Galectina-3 favorece a infecção por *B. abortus*, diminuindo a proteção do hospedeiro.

Como observamos que os camundongos Gal-3 KO são mais resistentes à infecção por *B. abortus*, nós nos perguntamos quais os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos protetores observados na ausência de Gal-3. Para responder a essa questão, animais C57BL/6 e Gal-3 KO foram infectados intraperitonealmente com 10^6 UFCs bacterianas. Após 2 semanas de infecção, os baços dos animais foram coletados e os homogenatos esplênicos isolados para análise da produção de mediadores inflamatórios através da técnica de ELISA. Observamos uma produção elevada de TNF- α (Fig. 13 C), IFN- γ (Fig. 13 D), IL-12 (Fig. 13 E) e NO (Fig. 13 H) em baços de camundongos Gal-3 KO em comparação com o grupo selvagem. Além disso também observamos uma queda na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Fig 13 F) e de CXCL10 (Fig. 13 G) no baço de camundongos Gal-3 KO comparado aos camundongos controle. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a Galectina-3 induzida durante a infecção por *B. abortus* desempenha um papel prejudicial na restrição da infecção em camundongos regulando componentes inflamatórios necessários para a proteção do hospedeiro.

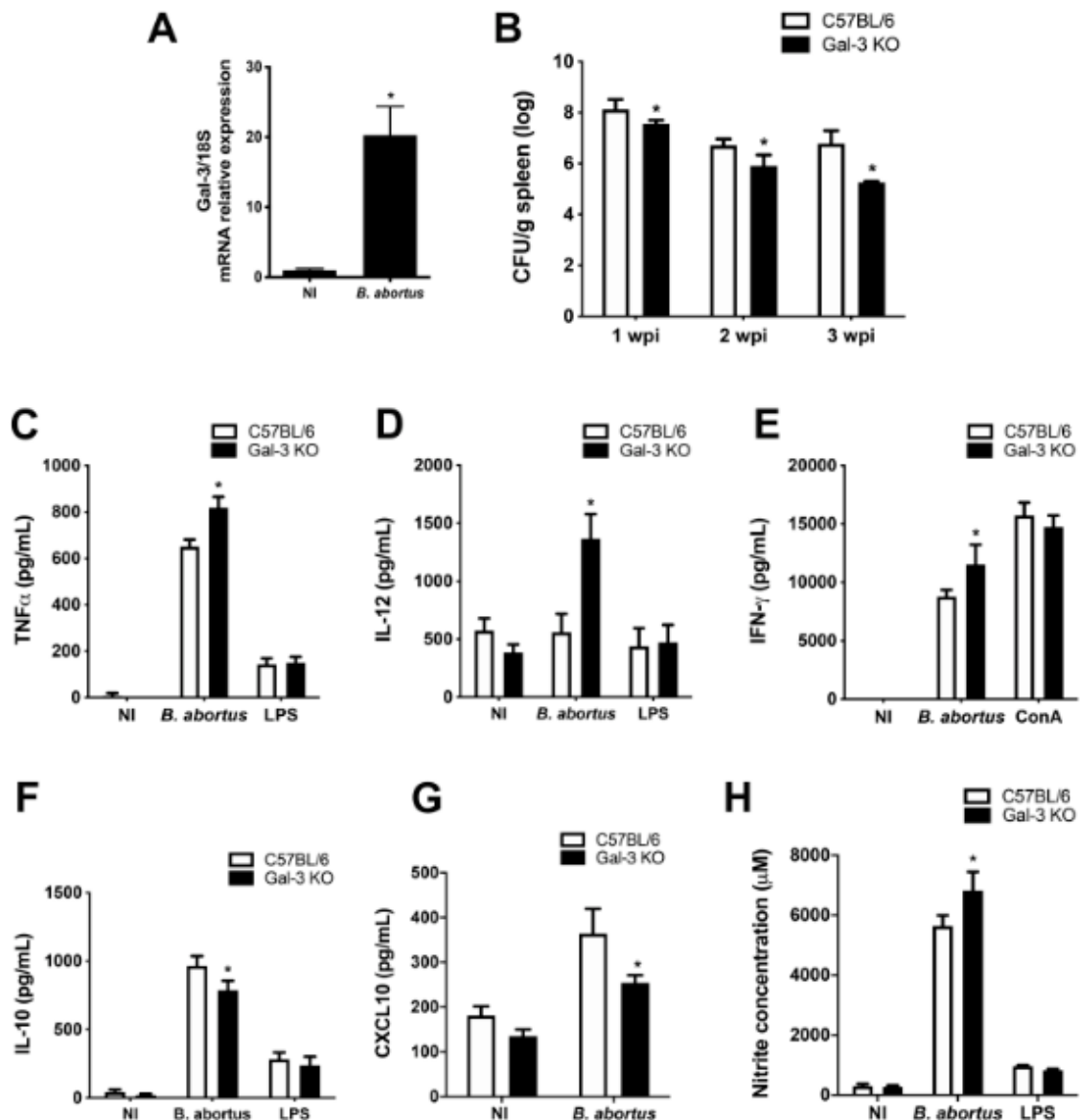


Figura 13: A deficiência de Gal-3 aumenta a proteção do hospedeiro contra a infecção por *B. abortus*. Camundongos da linhagem C57BL/6 permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 CFUs de *B. abortus*. Os baços foram extraídos e a qPCR foi realizada para medir a expressão do gene Galectina-3, 2 semanas após a infecção (A). Camundongos da linhagem C57BL/6 e Gal-3KO permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 CFUs de *B. abortus*. Os camundongos foram sacrificados em 1, 2 e 3 semanas após a infecção e homogenatos de baço diluídos foram adicionados a placas de ágar de meio BB para determinação de CFU (B). As células do baço de camundongos C57BL / 6 e Gal-3 KO infectados por 2 semanas foram cultivadas com *B. abortus* (MOI: 100), ConA (5 mg / ml), LPS de *E. coli* (1 μg / mL) ou somente meio DMEM por 12, 48 e 72 horas e a produção das citocinas TNF-α (C), IL-12 (D), IFN-γ (E), IL-10 (F) e CXCL10 (G) foram detectados por ELISA. Em relação ao óxido nítrico, a concentração de nitrito foi medida pela reação de Griess (mM) utilizando os mesmos estímulos descritos para as dosagens de citocinas (H). Os dados são representativos de três experimentos independentes. * p <0,05 em comparação com camundongos do tipo selvagem, two-way ANOVA.

5.7 A Galectina-3 regula o recrutamento de células imunes inatas

Para avaliar ainda mais a resistência de animais Gal-3 KO, nós decidimos analisar o perfil de recrutamento de células imunes nesses animais. Para isso, camundongos C57BL/6 e Gal-3 KO foram infectados intraperitonealmente com 10^6 UFCs de *B. abortus*. Após 2 semanas de infecção, analisamos os números de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos no baço dos animais através de citometria de fluxo. Como esperado, o baço dos animais WT e Gal-3 KO não infectados não diferiram no recrutamento de células imunes. No entanto, observamos um maior número de macrófagos (Fig. 14 A), células dendríticas (Fig. 14 B) e neutrófilos (Fig 14 C) no baço de camundongos Gal-3 KO infectados com *B. abortus* em comparação aos baços de animais selvagens infectados. Além disso, submetemos homogenatos esplênicos de camundongos C57BL/6 e Gal-3 KO infectados com *B. abortus* a um ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO) para corroborar se camundongos deficientes em Gal-3 mostravam maior recrutamento de neutrófilos. Dessa forma, observamos na figura 14 D uma atividade aumentada de MPO em homogenatos esplênicos de camundongos Gal-3 KO infectados com *B. abortus* em comparação com homogenatos dos camundongos controle. Coletivamente, esses dados mostraram que Galectina-3 induzida durante a infecção por *B. abortus* limita o recrutamento de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos para o sítio da infecção.

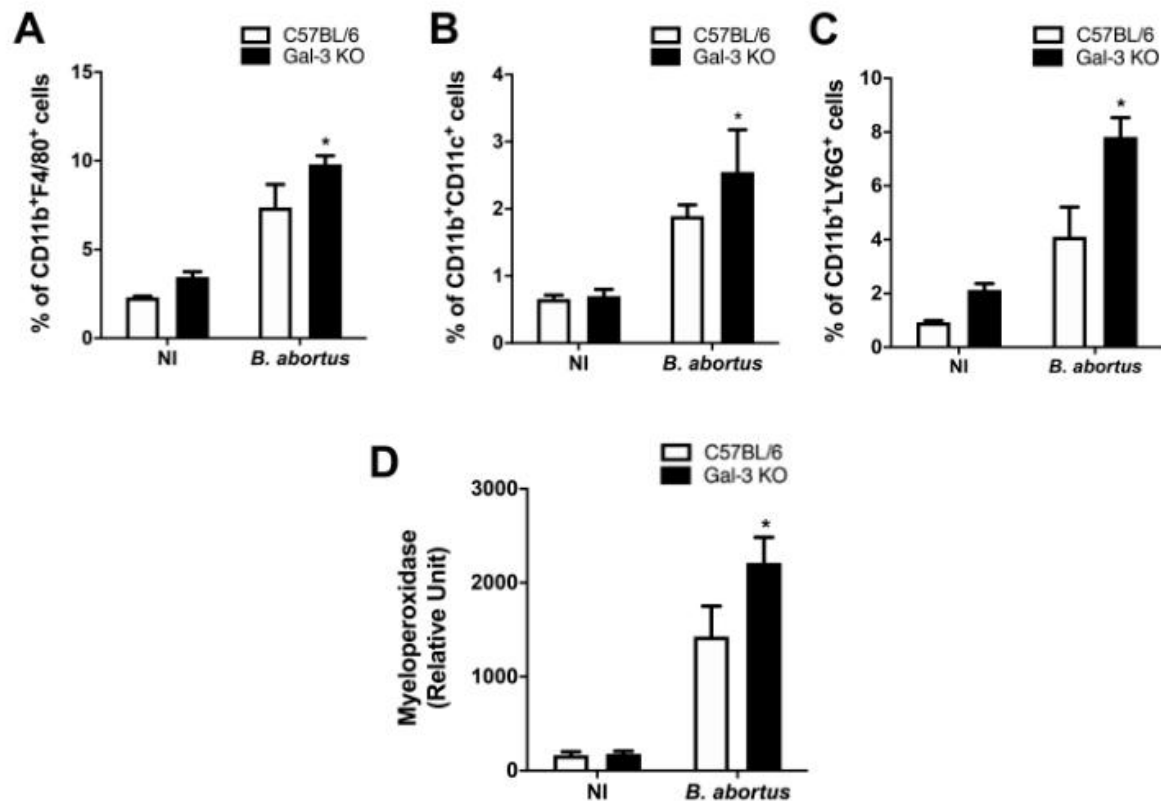


Figura 14: A Galectina-3 regula o recrutamento de células imunes inatas. Camundongos da linhagem C57BL/6 e Gal-3 KO permaneceram não infectados (NI) ou foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 CFUs de *B. abortus* por 2 semanas. As células do baço dos camundongos C57BL/6 e Gal-3 KO foram marcadas *ex-vivo* para análise de citometria de fluxo. As células foram avaliadas para CD11b + F4 / 80 + (A), CD11b + CD11c + (B) e CD11b + Ly6G + (C). Os homogenatos esplênicos de ambos os grupos de camundongos NI ou infectados com *B. abortus* foram submetidos a um ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO) (D). Os dados são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação com camundongos do tipo selvagem, two-way ANOVA.

6- DISCUSSÃO

Bactérias patogênicas utilizam diferentes estratégias para entrar e estabelecer infecção dentro do hospedeiro. O sistema imunológico possui mecanismos de reconhecimento de uma ampla gama dessas bactérias. Recentemente, a Galectina-3 intracelular foi caracterizada como um sensor de ruptura vacuolar que detecta bactérias que entram ativamente no citosol da célula hospedeira (Paz et al., 2010). No entanto, o papel da Gal-3 durante a infecção por *B. abortus* ainda era desconhecido. Nesse estudo, mostramos que *B. abortus* induziu a expressão de Gal-3 em macrófagos e no baço de camundongos, corroborando estudos anteriores que mostram que infecções por diferentes patógenos resultam em aumento de expressão de Gal-3 em diferentes células e tecidos. (Diaz-Alvarez, Ortega; 2017). Além disso, já foi relatado que a Gal-3 se liga diretamente a patógenos como *Neisseria meningitidis* ou pode se acumular em fagossomos contendo *Listeria monocytogenes* (Weng et al., 2018). Do mesmo modo, em nosso trabalho, observamos que a Gal-3 decora os BCVs, indicando uma co-localização entre Gal-3 e os BCVs. Embora tenha sido demonstrado que a Gal-3 é induzida e se liga a diferentes microorganismos, os mecanismos pelos quais esses eventos ocorrem durante a infecção por *Brucella* era desconhecido.

Para avaliar a importância do sistema de secreção do tipo IV de *B. abortus* para a indução de Gal-3, infectamos macrófagos com *B. abortus* $\Delta virB$ e observamos que o T4SS fornece um padrão de patogênese que induz a expressão completa de Gal-3. No entanto, é possível que a menor expressão de Gal-3 em macrófagos infectados com a cepa $\Delta virB$ em comparação aos macrófagos infectados com a cepa selvagem possa estar relacionado a diferentes localizações intracelulares ou replicação de bactérias em diferentes pontos de tempo e mais experimentos são necessários para confirmar o papel do T4SS na indução da expressão de Gal-3. Confirmando a importância dos sistemas de secreção bacterianos para a indução e o recrutamento de Gal-3 para PVs, um estudo recente demonstrou que a presença do sistema de secreção do tipo IV de *L. Pneumophila* era necessário para o recrutamento de Gal-3 para os vacúolos contendo *L. Pneumophila* (Feeley et al., 2017). De fato, o sistema de secreção é responsável pela injeção de proteínas efetoras no citoplasma celular do hospedeiro (Celli, 2015) e pelo comprometimento da integridade da membrana do vacúolo contendo

patógeno (Chen et al., 2014) e dessa forma, pode ser responsável pela indução e recrutamento de Gal-3 para os BCVs.

A interação de Gal-3 com patógenos pode influenciar de diferentes formas no processo inflamatório, e seu papel no decurso da infecção depende de diferentes fatores como interação direta com o patógeno, ligação extracelular a receptores de membrana, ou modulação de proteínas intracelulares (Diaz-Alvarez, Ortega; 2017). Neste estudo, observamos que a Gal-3 regulou as respostas de IFN do tipo I após a infecção por *B. abortus*. Aqui, mostramos que macrófagos Gal-3 KO infectados com *B. abortus* diminuíram os transcritos de mRNA de IFN- β e a produção de CXCL10 quando comparados aos macrófagos WT. Vários estudos demonstraram que os IFN do tipo I podem atuar tanto de forma benéfica quanto de maneira prejudicial ao hospedeiro durante infecções bacterianas. (McNab et al., 2015; Boxx, Cheng, 2016; Kovarik et al., 2016). Um estudo demonstrou que o IFN do tipo I foi crucial para a resistência do hospedeiro em um modelo de infecção por *S. pneumoniae*, e a susceptibilidade aumentada de camundongos IFNAR KO foi correlacionada com maiores contagens de UFCs e maior dano tecidual pulmonar em comparação com o controle (Maier et al., 2016). Por outro lado, a sinalização do IFN do tipo I foi prejudicial durante a infecção por *L. Monocytogenes*, onde um menor título de bactérias foi recuperado no fígado de camundongos IFNAR KO em comparação com camundongos controle. (Rayamajhi M et al., 2010)

No contexto da infecção por *B. abortus*, nosso grupo demonstrou que a sinalização de IFN do tipo I é prejudicial ao controle da infecção, regulando componentes inflamatórios necessários para a proteção do hospedeiro como IFN γ e NO (Almeida et al., 2011).

De fato, neste estudo, observamos que Gal-3 é prejudicial à restrição de infecção por *B. abortus*, uma vez que números bacterianos reduzidos foram encontrados em macrófagos Gal-3 KO quando comparados com macrófagos WT. Além disso, demonstramos também que os macrófagos Gal-3 KO tratados com IFN- β recombinante de camundongo apresentaram maior quantidade de CFU de *B. abortus in vitro*, indicando um papel prejudicial do IFN- β induzido por Gal-3 na replicação de *Brucella*. Anteriormente, nosso grupo demonstrou que *B. abortus* induz a sinalização de IRF3 resultando em fosforilação de STAT1 e produção de IFN- β em macrófagos (Almeida et al., 2011). Em nosso estudo, observamos que concomitantemente com a diminuição de IFN- β , macrófagos Gal-3 KO infectados com *B. abortus* apresentaram fosforilação de STAT-1 reduzida em comparação com células WT.

Neste contexto, sugerimos que Gal-3 pode ser prejudicial para o controle de infecção por *B. abortus* e um possível mecanismo poderia ser induzindo respostas de IFN tipo I. Um estudo (Lazar et al., 2015) mostrou que a participação de Gal-3 também pode ser prejudicial para o hospedeiro durante a infecção pelo vírus da influenza A, onde células epiteliais das vias aéreas primadas com rGal-3 apresentaram uma maior fosforilação de STAT-1, resultando em uma liberação desregulada de citocinas pró-inflamatórias enquanto citocinas anti-inflamatórias como IL-10 permaneceram inalteradas levando a uma resposta exagerada e choque séptico. Nesse contexto, fornecemos evidências que a Gal-3 pode ser prejudicial ao hospedeiro ao governar respostas de IFN do tipo I durante a infecção de macrófagos por *B. abortus*.

Os mecanismos efetores dos IFNs tipo I derivam de produtos de genes que são regulados transcricionalmente pela sinalização de IFNs tipo I (Decker et al., 2005; Kovarik et al., 2016). Através dessa via, ocorre a expressão de diversos fatores de resistência do hospedeiro, incluindo IRGs e GBPs (Pilla et al., 2016; Kim et al., 2016; Feeley et al., 2017). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a infecção por *B. abortus* induz a formação de agregados de GBP2 localizados nas proximidades de BCVs e que a maquinaria dos GBPs é importante para o rompimento do BCV (Costa Franco et al., 2017). Os mecanismos pelos quais os GBPs detectam e se ligam a vacúolos permanecem mal caracterizados, no entanto, foi demonstrado que a Gal-3 apresenta um papel crítico na entrega de GBP2 para vacúolos contendo *Legionella* e *Yersinia* (Feeley et al., 2017). Em nosso trabalho, demonstramos que, apesar de uma diminuição parcial da expressão de GBPs e na colocalização de GBP2 com BCVs em macrófagos Gal-3 KO, a Galectina-3 não é diretamente necessária para o rompimento do BCV durante a infecção por *B. abortus*. Provavelmente, isso ocorre porque o reconhecimento de vacúolos contendo patógenos mediado por Gal-3 não é a única maneira pela qual o hospedeiro pode fornecer GBPs para PVs. Por exemplo, foi descrito que o recrutamento de GBPs para vacúolos de *Chlamydia* e *Toxoplasma* requer as GTPases induzíveis por IFN- γ Irgm1 e Irgm3 (Haldar AK et al., 2013; Haldar AK et al., 2015; Feeley et al., 2017). Assim, no contexto da infecção por *B. abortus*, estratégias futuras devem ser realizadas para elucidar os mecanismos pelos quais as células hospedeiras podem transportar GBPs para BCVs independentemente de Gal-3.

O rompimento dos PVs é importante para liberar componentes bacterianos para o citosol da célula hospedeira e consequentemente permitir um maior acesso aos sensores citosólicos levando a ativação do inflamassoma (Man et al., 2016). Em estudos anteriores demonstramos que a ativação do inflamassoma e a piroptose são importantes para induzir imunidade protetora contra a infecção por *B. abortus*, e que esse processo requer GBPs funcionalmente ativos (Costa Franco et al., 2018; Cerqueira et al., 2018). Assim como no rompimento do BCV, nesse estudo observamos que a Gal-3 é dispensável para ativação do inflamassoma e piroptose em macrófagos infectados por *B. abortus*. Embora, Gal-3 e GBPs possam formar complexos de proteínas que se associam em PVs, (Feeley et al., 2017), durante a infecção por *B. abortus*, a ativação do inflamassoma e a piroptose ocorrem independentemente de Gal-3. A possibilidade de redundância funcional entre Gal-3 e outras moléculas capazes de recrutar GBPs para vacúolos de patógenos pode explicar o motivo pelo qual porque macrófagos Gal-3 KO mostraram níveis semelhantes da ativação do inflamassoma e piroptose quando comparada às células de camundongos WT durante a infecção por *B. abortus*.

Estudos anteriores demonstraram que a Gal-3 está frequentemente associada à um prejuízo ao hospedeiro, regulando componentes inflamatórios necessários para a proteção e restrição da infecção (Quattroni et al., 2012; Li et al., 2018; Weng et al., 2018). Durante a infecção por *Salmonella typhimurium*, Li e colaboradores (2018) demonstraram que camundongos Gal-3 KO eram menos suscetíveis à infecção, e esse fenótipo de resistência foi correlacionado com baixos números de UFC bacterianas no baço e maior indução de citocinas pró-inflamatórias e produção de NO. Em um modelo de infecção por *Toxoplasma gondii*, células dendríticas de camundongos deficientes em Gal-3 produzem maiores quantidades de IL-12 e, consequentemente, induzem uma robusta resposta polarizada Th1 quando comparadas às células dendríticas de animais WT (Bernardes et al., 2006). Em nosso estudo, observamos que Gal-3 é prejudicial ao controle da infecção por *B. abortus* também *in vivo*. A análise da carga bacteriana mostrou que camundongos Gal-3 KO abrigavam números menores de *Brucella* nos baços em comparação com camundongos WT em 1, 2 e 3 semanas após a infecção, corroborando nossos dados *in vitro*. De fato, a resistência à infecção por *B. abortus* observada em camundongos Gal-3 KO foi acompanhada por esplenócitos com maior produção de IFN- γ , TNF- α , IL-12 e NO, componentes críticos para o controle da infecção por

Brucella. Além disso, níveis reduzidos de IL-10 foram detectados. Na verdade, há evidências crescentes que demonstram uma correlação entre as vias de IFN tipo I e IFN tipo II. A produção de IFN- $\alpha\beta$ em resposta a infecção por *L. monocytogenes* diminuiu a expressão do receptor de IFN- γ (IFNGR) 1, reduzindo a responsividade de células ao IFN- γ e consequentemente o controle da infecção (Rayamajhi et al., 2010). No nosso trabalho, observamos uma maior produção de IFN- γ em esplenócitos de camundongos Gal-3 KO e menor expressão de CXCL10 no baço de camundongos Gal-3 KO infectados com *B. abortus* em comparação com o baço de camundongos WT. Essa pode ser uma evidência que corrobore com o *crosstalk* entre as vias de IFN do tipo I e IFN do tipo II e pode explicar, ao menos parcialmente, o efeito prejudicial da via do IFN do tipo I no controle da infecção por *B. abortus* (Almeida et al., 2011). No entanto, estudos futuros devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Além disso, mostramos que camundongos Gal-3 KO apresentaram maior número de neutrófilos, células dendríticas e macrófagos em comparação com camundongos C57BL/6. O maior recrutamento de leucócitos em baços de animais Gal-3 KO pode se correlacionar com números mais baixos de CFU bacterianas no órgão dos camundongos. Recentemente, foi demonstrado que Gal-3 induzida durante a sepse é prejudicial e inibe a migração de neutrófilos que facilita a disseminação bacteriana (Ferreira et al., 2018). Animais Gal-3 KO apresentaram baixo número de UFC bacterianas no sangue e exsudato peritoneal, além de maior recrutamento de neutrófilos para o local de infecção em modelo de sepse (Ferreira et al., 2018). Anteriormente, em um estudo do nosso grupo, mostramos que o aumento da carga de *Brucella* observada em camundongos Caspase11 e Gasdermin-D KO estava relacionado à deficiência de recrutamento e ativação de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (Cerqueira et al., 2018). Além disso, a depleção de neutrófilos de animais infectados de tipo selvagem revelou que a falta de neutrófilos diminuiu a resistência do camundongo à infecção por *Brucella* (Cerqueira et al., 2018).

Em conjunto, nossos resultados levam a um modelo no qual a Gal-3 induzida durante a infecção por *B. abortus* desempenha um papel prejudicial na restrição da replicação bacteriana. Nesse estudo, demonstramos que Gal-3 atua limitando o recrutamento de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos para o local da infecção, regulando componentes inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias e NO, além de induzir respostas de IFN do

tipo I que poderiam ser benéficas para a persistência de *B. abortus* no hospedeiro. (Figura modelo).

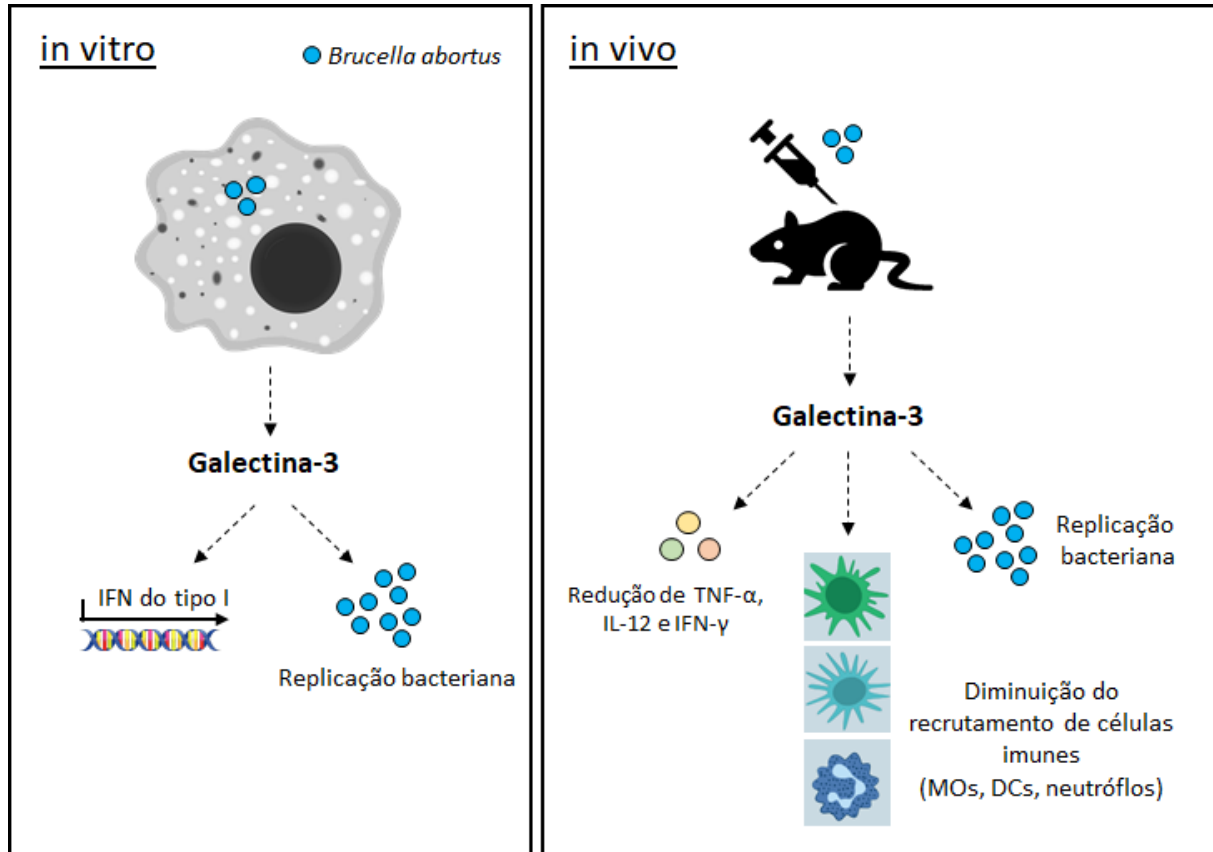


Figura 15: Modelo esquemático proposto para o papel da Galectina-3 em resposta à infecção por *B. abortus* in vitro e in vivo. A infecção por *B. abortus* induz a expressão de Galectina-3 em macrófagos e no baço de camundongos. Nesse contexto, a Gal-3 atua induzindo respostas de INF do tipo I que são benéficas para a persistência de *B. abortus*. Além disso, a Gal-3 induzida durante a infecção, atua limitando o recrutamento de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos para o local da infecção, regulando componentes inflamatórios como TNF- α , IL-12 e IFN- γ além de NO. Assim, a Galectina-3 favorece a replicação de *B. abortus*.

7 - CONCLUSÃO

A bucelose é a zoonose mais difundida no mundo e, apesar disso, representa uma das sete doenças mais negligenciadas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, causando inúmeros prejuízos na pecuária, além de ser um grande problema de saúde pública. Os resultados obtidos nesse trabalho ajudam no entendimento dos mecanismos relacionados a resposta imune frente à infecção por *B. abortus*. Observamos que a infecção por *B. abortus* induz a expressão de Galectina-3. Além disso, a Gal-3 se mostrou importante para a indução de respostas de IFN do tipo I e para a expressão de GBPs, porém, não foi essencial para o rompimento do BCV e para a ativação do inflamassoma. Por fim, observamos que a Gal-3 favorece a replicação bacteriana uma vez que modula a produção de citocinas pró-inflamatórias e prejudica o recrutamento de células importantes para o controle da infecção. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo fornecem informações relevantes para entender o papel da Gal-3 durante infecções e como essa molécula pode contribuir para a sobrevivência bacteriana e a progressão da doença, além de elucidar mecanismos potenciais de proteção do hospedeiro contra *B. abortus*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. A., CARVALHO, N. B., OLIVEIRA, F. S., LACERDA, T. L., VASCONCELOS, A. C., NOGUEIRA, L., OLIVEIRA, S. C. (2011). MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN-beta induction in response to *Brucella abortus* infection. **PLoS One**, 6(8), e23135.
- ARAYA, L. M.; ELZER, P. H.; ROWE, G. R.; ENRIGHT, R. M.; WINTER, A. J. (1989) Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. **J. Immunol.**, 143: 3330-3337.
- ARCHAMBAUD, C., SALCEDO, S.P., LELOUARD, H., DEVILARD, E., DE BOVIS, B., VAN ROOIJEN, N., GORVEL, J.P., AND MALISSEN, B. (2010). Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. **European journal of immunology** 40, 3458-3471.
- ATLURI, V.L., XAVIER, M.N., DE JONG, M.F., DEN HARTIGH, A.B., TSOLIS, R.M., 2011. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. **Annual review of microbiology** 65, 523-541.
- BALDWIN C.L. & GOENKA R. (2006). – Host immune responses to the intracellular bacterium *Brucella*: does the bacterium instruct the host to facilitate chronic infection? **Crit. Rev. Immunol.**, 26, 407–442 .
- BASERAS, B., ET AL.,(2012) Galectin-3 inhibits the chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils in vitro. **Immunobiology**, 217(1): p. 83- 90.
- BERNARDES, E. S., SILVA, N. M., RUAS, L. P., MINEO, J. R., LOYOLA, A. M., HSU, D. K.ROQUE-BARREIRA, M. C.(2006). *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **The American Journal of Pathology**, 168 (6), 1910–1920.
- BOXX, G. M., & CHENG, G. (2016). The roles of type I interferon in bacterial infection. **Cell Host & Microbe**, 19(6), 760–769.
- BRUCE, D. (1887). Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. **The Practitioner** 39, 161-170.
- CAMPOS, P. C., GOMES, M. T. R., MARINHO, F. A. V., GUIMARAES, E. S., DE MOURA LODI CRUZ, M. G. F., & OLIVEIRA, S. C. (2019). *Brucella abortus* nitric oxide metabolite regulates inflammasome activation and IL-1beta secretion in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, 49 (7), 1023–1037.
- CARDOSO, P. G., MACEDO, G. C., AZEVEDO, V. & OLIVEIRA, S. C. (2006) *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories** 11, 1–11.

CAROFF, M., KARIBIAN, D., CAVAILLON, J.M., AND HAEFFNER-CAVAILLON, N. (2002). Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes and infection** 4, 915-926.

CELLI, J., (2015). The changing nature of the Brucella-containing vacuole. **Cellular microbiology** 17, 951-958.

CELLI, J., DE CHASTELLIER, C., FRANCHINI, D.-M., PIZARRO-CERDA, J., MORENO, E., AND GORVEL, J.-P. (2003) Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. **J Exp Med** 198: 545–556.

CERQUEIRA DM, GOMES MTR, SILVA ALN, RUNGUE M, ASSIS NRG, GUIMARÃES ES, MORAIS SB, BROZ P, ZAMBONI DS, OLIVEIRA SC (2018) Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to Brucella abortus infection. **PLoS Pathog.** 27;14 12.

CHEN, H. Y., WENG, I. C., HONG, M. H., & LIU, F. T. (2014). Galectins as bacterial sensors in the host innate response. **Current Opinion in Microbiology**, 17, 75–81.

CHRISTOPHER, S, B L Umapathy, K L Ravikumar (2010) Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. **J Lab Physicians.** 2.2 55–61

CHUNG, P. A. SIELING, M. SCHENK ET AL., “Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes,” **The Journal of Infectious Diseases.** 207, 6,. 947– 956, 2013.

CORBEL MJ (1997). Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, 3(2):213-221.

COSTA FRANCO MM, MARIM F, GUIMARÃES ES, ASSIS NRG, CERQUEIRA DM, ALVES-SILVA J, HARMS J, SPLITTER G, SMITH J, KANNEGANTI TD, DE QUEIROZ NMGP, GUTMAN D, BARBER GN, OLIVEIRA SC. (2018) Brucella abortus Triggers a cGAS-Independent STING Pathway To Induce Host Protection That Involves Guanylate Binding Proteins and Inflammasome Activation. **J Immunol.** 200.607-622.

CUTLER, S. J., WHATMORE, A. M. & COMMANDER, N. J. (2005) Brucellosis – new aspects of an old disease. **J Appl Microbiol.** 98. 1270–1281

DECKER, T., MULLER, M., & STOCKINGER, S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. **Nature Reviews Immunology**, 5 (9), 675–687.
 DELRUE, R.M., MARTINEZ-LORENZO, M., LESTRATE, P., DANESE, I., BIELARZ, V., MERTENS, P., ET AL. (2001) Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking. **Cell Microbiol** 3: 487–497

- DERRÉ I, RACHEL S, HERVÉ A, (2011) The lipid transfer protein CERT interacts with the Chlamydia inclusion protein IncD and participates to ER-Chlamydia inclusion membrane contact sites. **PLoS Pathog.** 7(6):e1002092.
- DUMIC, J., DABELIC, S., FLÖGEL, M., (2006). Galectin-3: An open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760, 616–635.
- ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E., AND POXTON, I.R. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and infection** 4, 837-851.
- FEELEY, E. M.; PILLA-MOFFETT, D. M.; ZWACK, E. E.; ET AL. (2017) Galectin-3 directs antimicrobial guanylate binding proteins to vacuoles furnished with bacterial secretion systems. **Proc Natl Acad Sci.** 28;114(9)
- FERREIRA, R. G., RODRIGUES, L. C., NASCIMENTO, D. C., KANASHIRO, A., MELO, P. H., BORGES, V. F., ALVES-FILHO, J. C. (2018). Galectin-3 aggravates experimental polymicrobial sepsis by impairing neutrophil recruitment to the infectious focus. **The Journal of Infection**, 77. 5, 391–397
- FIGUEIREDO, P., FICHT, T. A., RICE-FICHT, A., ROSSETTI, C. A. & ADAMS, L. G.(2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions. **Am. J. Pathol.** 185, 1505–1517.
- FOULONGNE, V., OUAHRANI-BETTACHE, S., TEYSSIER, J. & RAMUZ, M (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of Brucella suis deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. **Proc Natl Acad Sci** 99, 15711-15716
- FOWLER, R. J. THOMAS, J. ATHERTON, I. S. ROBERTS, AND N. J. HIGH, (2006) Galectin-3 binds to Helicobacter pylori O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to H. pylori adhesion, **Cellular Microbiology**, 8,. 44–54
- FRADIN, C., POULAIN, D. & JOUAULT, T. (2000) β -1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein. **Infect Immun.** 68 :4391-8
- GARCIA-CARRILLO, C.,(1987). La Brucelosis de los animales en America y su relacion con la infeccion humana. **Office International des Epizooties.** 43–70.
- GOMES MT, CAMPOS PC, DE ALMEIDA LA, OLIVEIRA FS, COSTA MM, MARIM FM, PEREIRA GS, OLIVEIRA SC. (2012) The role of innate immune signals in immunity to Brucella abortus. **Front Cell Infect Microbiol.** 25 2130.
- GOMES, M.T., CAMPOS, P.C., OLIVEIRA, F.S., CORSETTI, P.P., BORTOLUCI, K.R., CUNHA, L.D., ZAMBONI, D.S., OLIVEIRA, S.C., (2013). Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to Brucella abortus infection. **J Immunol** 190, 3629-3638.

GOMES, M.T., CAMPOS, P.C., PEREIRA GDE, S., BARTHOLOMEU, D.C., SPLITTER, G., OLIVEIRA, S.C., (2016). TLR9 is required for MAPK/NF-kappaB activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. **Journal of leukocyte biology** 99, 771-780.

GOMES, M.T.R., CERQUEIRA, D.M., GUIMARAES, E.S., CAMPOS, P.C., OLIVEIRA, S.C., (2019) .Guanylate-binding proteins at the crossroad of noncanonical inflammasome activation during bacterial infections. **Journal of leukocyte biology**. 106:553-562.

GORSKI, J. P., LIU, F. T., ARTIGUES, A., CASTAGNA, L. F. & OSDOBY, P. (2002). New alternatively spliced form of galectin-3, a member of the β -galactoside-binding animal lectin family, contains a predicted transmembrane-spanning domain and a leucine zipper motif. **J. Biol. Chem.** 277, 18840–18848

HALDAR, A. K., FOLTZ, C., FINETHY, R., PIRO, A. S., FEELEY, E. M., PILLAMOFFETT, D. M. COERS, J. (2015). Ubiquitin systems mark pathogencontaining vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112 5628–5637.

HALDAR, A. K., SAKA, H. A., PIRO, A. S., DUNN, J. D., HENRY, S. C., TAYLOR, G. A., COERS, J. (2013). IRG and GBP host resistance factors target aberrant, "non-self" vacuoles characterized by the missing of "self" IRGM proteins. **PLoS Pathogens**, 9 6, 1003 14.

HALLING, S. M, PETERSON-BURCH B D, BRICKER B. J, BROOKE D. ZUERNER L.Z, ZHANG Q, LI L, KAPUR V, DAVID P., STEVEN C. OLSEN (2005). Completion of the Genome Sequence of *Brucella abortus* and Comparison to the Highly Similar Genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of bacteriology** 187, 2715–2726.

HIRABAYASHI, J. ET AL. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. **Biochim. Biophys. Acta** 1572, 232–254

HORWITZ MA. (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. **J. Exp. Med.** 158: 1319–1331.

IPPEL, M. C. MILLER, S. VÈRTESY ET AL.,(2016) “Intra- and intermolecular interactions of human galectin-3: assessment by fullassignment-based NMR,” **Glycobiology**, 26, 888–903.

JONES, J. W. ET AL. (2010). Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 107, 9771–9776.

KADROFSKE, K. P. OPENO, AND J. L. WANG, (1998) “The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter,” **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 349. 7–20.

KAWAI, T. & AKIRA, S. (2007) Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. **Trends Mol. Med.** 13, 460–469.

KAYAGAKI, N., WARMING, S., LAMKANFI, M., VANDE WALLE, L., LOUIE, S., DONG, J., NEWTON, K., QU, Y., LIU, J., HELDENS, S., ET AL. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature** 479, 117–121.

KIM, B. H., CHEE, J. D., BRADFIELD, C. J., PARK, E. S., KUMAR, P., & MACMICKING, J. D. (2016). Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense. **Nature Immunology**, 17, 481–489.

KIM, B.H., SHENOY, A.R., KUMAR, P., DAS, R., TIWARI, S., MACMICKING, J.D., (2011). A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. **Science** 332, 717–721.

KOVARIK, P., CASTIGLIA, V., IVIN, M., & EBNER, F. (2016). Type I interferons in bacterial infections: A balancing act. **Frontiers in Immunology**, 7, 652.

LEE, B. Envelope–receptor interactions in Nipah virus pathobiology. (2007). **Ann. NY Acad. Sci.** 1102, 51–65.

LEVRONEY EL, AGUILAR HC, FULCHER JA, KOHATSU L, PACE KE, PANG M, GURNEY KB, BAUM LG, LEE B. (2005) 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. **J Immunol.** 175 413–420.

LI, Y., KOMAI-KOMA, M., GILCHRIST, D.S., HSU, D.K., LIU, F.-T., SPRINGALL, T., XU, D., (2009). Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. **J. Immunol.** 181, 2781–9

LIPKOWITZ, M. S., LEAL-PINTO, E., COHEN, B. E. & ABRAMSON, R. G. (2004) Galectin 9 is the sugar-regulated urate transporter/channel UAT. **Glycoconj. J.** 19, 491–498.
LIPPMANN J, MULLER HC, NAUJOKS J, TABELING C, SHIN S, WITZENRATH M, ET AL. (2011) Dissection of a type I interferon pathway in controlling bacterial intracellular infection in mice. **Cell Microbiol** 13:1668–82.

LIU, F.T. AND RABINOVICH, G.A. (2005) Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer** 5, 29–41

MACEDO, G. C., MAGNANI, D. M., CARVALHO, N. B., BRUNA-ROMERO, O., GAZZINELLI, R. T., & OLIVEIRA, S. C. (2008). Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **Journal of Immunology**, 180, 1080–1087.

MAIER, B. B., HLADIK, A., LAKOVITS, K., KOROSK, A., MARTINS, R., KRAL, J. B., & KNAPP, S. (2016). Type I interferon promotes alveolar epithelial type II cell survival

during pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection and sterile lung injury in mice **European Journal of Immunology**, 46, 2175–2186

MAN, S. M., KARKI, R., SASAI, M., PLACE, D. E., KESAVARDHANA, S., TEMIROV, J., KANNEGANTI, T. D. (2016). IRGB10 liberates bacterial ligands for sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes. **Cell**, 167, 382–396.

MARIM, F.M., FRANCO, M.M., GOMES, M.T., MIRAGLIA, M.C.,GIAMBARTOLOMEI, G.H., OLIVEIRA, S.C., (2017). The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during *Brucella abortus* infection. **Seminars in immunopathology** 39, 215-223

MARTIROSYAN, A. & GORVEL, J. (2013) *Brucella* evasion of adaptive immunity. **Future Microbiology** 147–154.

MCNAB, F., MAYER-BARBER, K., SHER, A., WACK, A., & O'GARRA, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews. Immunology**, 15, 87–103.

MILLER, H. IPPEL, D. SUYLEN ET AL., (2016). “Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain,” **Glycobiology**, 26, 88–99,

MISHRA, B. B.; LI, Q.; STEICHEN, A. L.; ET AL.,(2013). Galectin-3 Functions as an Alarmin: Pathogenic Role for Sepsis Development in Murine Respiratory Tularemia. **PLoS ONE**, 8, 5961- 5973.

MONROE KM, MCWHIRTER SM, VANCE RE. (2010) Induction of type I interferons by bacteria. **Cell Microbiol** 12:881–90.

OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G. A. (1995) CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45 RBl^o T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. **Eur. J. Immunol.**, 25: 2551-7, O'NEILL, L.A., AND BOWIE, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature reviews Immunology** 7, 353-364

ORTEGA & E DIAZ-ALVAREZ, L., (2017). The many roles of Galectin-3, a multifaceted molecule, in Innate Immune Responses against pathogens. **Mediators Inflamm** 92 47574.

PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P., AKRITIDIS, N., CHRISTOU, L. & TSIANOS, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. **Lancet Infect Dis** 6, 91–99.

PARK, J.-H. ET AL. (2007). RICK/RIP2 Mediates Innate Immune Responses Induced through Nod1 and Nod2 but Not TLRs. **J. Immunol.** 178, 2380–2386.

PASQUEVICH, K. A. ET AL. (2010) The Protein Moiety of *Brucella abortus* Outer Membrane Protein 16 Is a New Bacterial Pathogen-Associated Molecular Pattern That Activates Dendritic Cells In Vivo, Induces a Th1 Immune Response, and Is a Promising Self Adjuvanting Vaccine against Systemic a. **J. Immunol.** 184, 5200–5212.

PATNAIK, S. K. ET AL (2006). Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. **Glycobiology** 16, 305–317.

PATTERSON, R. J., DAGHER, S. F., VYAKARNAM, A. & WANG, J. L. (1997). Nuclear galectins: functionally redundant components in processing of pre-mRNA. **Trends Glycosci. Glycotechnol.** 9, 77–85.

PAZ I, ET AL. (2010) Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. **Cell Microbiol** 12 530–544.

PELLETIER, I. & SATO, S. (2002) Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. **J. Biol. Chem.** 277, 17663–17670

PELLETIER, I. ET AL (2003). 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. **J. Biol. Chem.** 278, 22223–22230.

PETR BROZ AND VISHVA DIXIT. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signaling. **Nature reviews Immunology** 16, 407–420

PILLA-MOFFETT, D., BARBER, M. F., TAYLOR, G. A., & COERS, J. (2016). Interferon-inducible GTPases in host resistance, inflammation and disease. **Journal of Molecular Biology**, 428, 3495–3513.

PIZARRO-CERDÁ, J., MÉRESSE, S., PARTON, R.G., VAN DER GOOT, G., SOLALANDA, A., LOPEZ-GOÑI, I., ET AL. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. **Infect Immun** 66: 5711–5724.

POESTER, P. F.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. (2002) Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, 90: 55-92.

QIN, Q.M., PEI, J., ANCONA, V., SHAW, B.D., FICHT, T.A., DE FIGUEIREDO, P., (2008). RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1 α in supporting *Brucella* replication. **PLoS pathogens** 4, 1000110.

QUATTRONI, P.; LI, Y.; LUCCHESI, D.; LUCAS, S.; HOOD, D.W.; HERRMANN, M.; GABIUS, H.J.; TANG, C.M.; EXLEY, R.M. (2012). Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells. **Cell Microbiol.** 14, 1657-75.

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

RATHINAM, V. A. K., VANAJA, S. K. & FITZGERALD, K. A. REGULATION OF INFLAMMASOME SIGNALING.(2012) **Nat. Immunol.** 13, 333–42.

RAYAMAJHI, M., HUMANN, J., PENHEITER, K., ANDREASEN, K., & LENZ, L. L. (2010). Induction of IFN- α enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . **The Journal of Experimental Medicine**, 207, 327–337.

SANTOS R. L; MARTINS M. T; BORGES M. A; PAIXÃO A.T; Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil (2013). **Pesq. Vet. Bras.** 33, 759-764.

SATO, C. ST-PIERRE, P. BHAUMIK, AND J. NIEMINEN (2009). Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble betagalactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), **Immunological Reviews**, 230. 172–187.

SATO, P. BHAUMIK, G. ST-PIERRE, AND I. PELLETIER (2014) Role of galectin-3 in the initial control of *Leishmania* infection, **Critical Reviews in Immunology**, 34 147–175.

SAUER, J. D. ET AL. (2010) *Listeria monocytogenes* triggers AIM2 mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. **Cell Host Microbe** 7, 412–419.

SHIMURA, T. ET AL. (2005) Implication of galectin-3 in Wnt Signaling. **Cancer Res** 65, 3535-3537

SKENDROS, P. & BOURA, P (2016) Immunity to brucellosis. **Rev. Sci. Tech.** 32, 137–147.

STARR, T., NG, T.W., WEHRLY, T.D., KNODLER, L.A., CELLI, J., 2008. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. **Traffic** 9, 678-694.

STOWELL, S. R. ET AL. (2008) Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. **J. Biol. Chem.** 283, 10109–10123.

TAYLOR, M. A. & DRICKAMER, K. (2003) Introduction to Glycobiology (**Oxford Univ. Press, New York**, 2003. 3rd ed.

UGALDE, R. A. (1999). Intracellular lifestyle of *Brucella* spp .Common genes with other animal pathogens plant pathogens , and endosymbionts. **Microbes and Infection.** 14. 1211–1219

VASTA, G.R (2012) Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 946, 21–36

VASTA, G. R. (2009). Roles of galectins in infection. **Nat. Rev. Microbiol.** 7, 424–438.

WATANABE T, ASANO N, FICHTNER-FEIGL S, GORELICK PL, TSUJI Y, MATSUMOTO Y, ET AL. (2010). NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. **J Clin Invest** 120:1645–62.

WEISS, D.S., TAKEDA, K., AKIRA, S., ZYCHLINSKY, A., MORENO, E., (2005). MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. **Infection and immunity** 73, 5137-5143.

WENG, I. C., CHEN, H. L., LO, T. H., LIN, W. H., CHEN, H. Y., HSU, D. K., & LIU, F. T. (2018). Cytosolic galectin-3 and -8 regulate antibacterial autophagy through differential recognition of host glycans on damaged phagosomes. **Glycobiology**, 28 392–405.

XAVIER, M.N., WINTER, M.G., SPEES, A.M., DEN HARTIGH, A.B., NGUYEN, K., ROUX, C.M., SILVA, T.M.A., ATLURI, V.L., KERRINNES, T., KEESTRA, A.M., MONACK, D.M., LUCIW, P.A., EIGENHEER, R.A., BÄUMLER, A.J., SANTOS, R.L., TSOLIS, R.M., (2013). PPAR γ -mediated increase in glucose availability sustains chronic brucella abortus infection in alternatively activated macrophages. **Cell Host Microbe** 14, 159–170

XU, D. (2008). Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. **Journal of Immunology**, 181, 2781–2789.

YAMAOKA, A. ET AL. (1995) A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. **J. Immunol.** 154, 3479–3487

YANG, R. Y., RABINOVICH, G. A. & LIU, F. T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Rev. Mol. Med.** 6, 10. 17.

YINGST S. & HOOVER D.L. (2003). – T cell immunity to brucellosis. **Crit. Rev.Microbiol.**, 29, 313–331.

ZAAS, D. W., DUNCAN, M., RAE WRIGHT, J. & ABRAHAM, S. N. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections.(2005) **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.** 1746, 305–313.

ZENG, X.; ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; SUN, X.-L. (2012) Carbohydrate–protein interactions and their biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**,. 402,. 3161–3176

9 ANEXO

9.1 Artigo gerado a partir desse trabalho (em anexo)

- Tana FL, Guimarães ES, Cerqueira DM, Campos PC, Gomes MTR, Marinho FV, Oliveira SC. Galectin-3 regulates proinflammatory cytokine function and favours *Brucella abortus* chronic replication in macrophages and mice. *Cell Microbiol.* 2021 Oct;23(10):e13375.

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Galectin-3 regulates proinflammatory cytokine function and favours *Brucella abortus* chronic replication in macrophages and mice

Fernanda L. Tana¹  | Erika S. Guimarães²  | Daiane M. Cerqueira¹  |
Priscila C. Campos¹  | Marco Túlio R. Gomes¹  | Fábio V. Marinho²  |
Sergio C. Oliveira^{1,2,3} 

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), CNPq MCT, Salvador, Brazil

Correspondence

Sergio C. Oliveira, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
Email: scozeus1@gmail.com

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 303044/2020-9, 406883/2018-1, 465229/2014-0; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Grant/Award Numbers: APQ-01945-17, REDE-00140-16; National Institutes of Health, Bethesda, MD, Grant/Award Number: R01 AI116453

Abstract

In this study, we provide evidence that galectin-3 (Gal-3) plays an important role in *Brucella abortus* infection. Our results showed increased Gal-3 expression and secretion in *B. abortus* infected macrophages and mice. Additionally, our findings indicate that Gal-3 is dispensable for *Brucella*-containing vacuoles disruption, inflammasome activation and pyroptosis. On the other hand, we observed that *Brucella*-induced Gal-3 expression is crucial for induction of molecules associated to type I IFN signalling pathway, such as IFN- β : Interferon beta (IFN- β), C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) and guanylate-binding proteins. Gal-3 KO macrophages showed reduced bacterial numbers compared to wild-type cells, suggesting that Gal-3 facilitates bacterial replication in vitro. Moreover, priming Gal-3 KO cells with IFN- β favoured *B. abortus* survival in macrophages. Additionally, we also observed that Gal-3 KO mice are more resistant to *B. abortus* infection and these animals showed elevated production of proinflammatory cytokines when compared to control mice. Finally, we observed an increased recruitment of macrophages, dendritic cells and neutrophils in spleens of Gal-3 KO mice compared to wild-type animals. In conclusion, this study demonstrated that *Brucella*-induced Gal-3 is detrimental to host and this molecule is implicated in inhibition of recruitment and activation of immune cells, which promotes *B. abortus* spread and aggravates the infection.

Take Aways

- *Brucella abortus* infection upregulates galectin-3 expression
- Galectin-3 regulates guanylate-binding proteins expression but is not required for *Brucella*-containing vacuole disruption
- Galectin-3 modulates proinflammatory cytokine production during bacterial infection
- Galectin-3 favours *Brucella* replication

KEYWORDS

Brucella abortus, galectin-3, guanylate-binding protein, inflammasome, type I IFN, vacuole

Abbreviations: BCVs, *Brucella*-containing vacuoles; BMDMs, bone marrow-derived macrophages; DCs, dendritic cells; Gal-3, galectin-3; GBPs, guanylate-binding proteins; T4SS, type IV secretion system.

1 | INTRODUCTION

Invading pathogens are first recognised by the innate immune system that cross-talks with the adaptive immune cells (Medzhitov, 2007).

Many structural components of pathogens constitute pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are directly sensed by host by pattern recognition receptors (Vance, Isberg, & Portnoy, 2009). In this scenario, the most common PAMPs found in bacteria are LPS, peptidoglycan, lipoproteins and nucleic acids (M. T. R. Gomes, Cerqueira, Guimaraes, Campos, & Oliveira, 2019; Kieser & Kagan, 2017).

Brucella abortus is a facultative intracellular bacterium that causes human and animal brucellosis. In domestic animals, the disease causes abortion and infertility, while in humans it leads to pathological manifestations such as undulant fever, debilitating arthritis, endocarditis and meningitis (de Figueiredo, Ficht, Rice-Ficht, Rossetti, & Adams, 2015). *Brucella* infection is associated with its ability to evade defence mechanisms and its efficiency in replicating in host dendritic cells (DCs) and macrophages that represent a niche for survival and initial replication of *B. abortus* (Archambaud et al., 2010; Atluri, Xavier, de Jong, den Hartigh, & Tsolis, 2011; Tian et al., 2019). Innate immunity against *B. abortus* involves the interaction with antigen-presenting cells (APCs) through recognition by diverse receptors (de Almeida et al., 2013; Giambartolomei et al., 2004; Marim et al., 2017). This recognition activates intracellular signalling pathways that lead to host proinflammatory immune responses that play an essential role in *B. abortus* infection control as well as immunopathology (Baldi & Giambartolomei, 2013; M. T. Gomes et al., 2012; M. T. Gomes et al., 2013; Macedo et al., 2008; Paludan & Bowie, 2013; Rodriguez, Delpino, Miraglia, & Giambartolomei, 2019).

Inside phagocytes, *B. abortus* resides in vacuoles termed *Brucella*-containing vacuoles (BCVs) that promote their survival, persistence and proliferation (Celli, 2015). Recently, we showed that during *B. abortus* infection, STING directly detects bacterial cyclic dinucleotide leading to a type I IFN response that upregulates several IFN-associated genes, such as guanylate-binding proteins (GBPs) (Costa Franco et al., 2018; Guimaraes et al., 2019). GBPs are possibly involved in lysis of pathogen-containing vacuoles (PCVs), releasing bacterial components into the host cell cytosol, leading to greater access to cytosolic sensors (M. T. R. Gomes et al., 2019; Man et al., 2016). In a previous study, we demonstrated that *Brucella* LPS is sensed by caspase-11 and that non-canonical inflammasome activation is critical to enhance the protective immunity against infection and to functionally active GBPs (Cerqueira et al., 2018).

The mechanisms by which GBPs bind and disrupt BCVs remain poorly characterised. A recent study showed that Gal-3 and murine GBP2 form protein complexes that associate with vacuoles containing *L. pneumophila* or *Y. pseudotuberculosis* (Feeley et al., 2017). Galectins are a group of conserved proteins characterised by the ability to bind β -galactosides through carbohydrate-recognition domains of about 130 amino acids (Collins, Bum-Erdene, Yu, & Blanchard, 2014; Quattroni et al., 2012; Vasta, 2012). Currently, 15 mammalian galectins have been reported; however, only Gal-3 has the ability to oligomerize and form pentamers, increasing interaction with its specific ligands (Nio-Kobayashi, 2017). Gal-3 can be extra- and intracellularly localised, and is highly expressed in macrophages, DCs and neutrophils. Gal-3 is found in the nucleus, cytosol and membranes as well as extracellularly after released from cells stimulated with LPS or IFN-

γ (Diaz-Alvarez & Ortega, 2017; Fritsch et al., 2016; Haudek et al., 2010; Yan et al., 2016). In this scenario, a role for Gal-3 in the innate immune system has been implicated. Recently, different roles have been attributed to Gal-3 in the immune response, such as to interact directly with pathogens surface glycans (Coers, 2017; Mey, Leffler, Hmama, Normier, & Revillard, 1996; Vasta, 2009). Previously published studies showed that intracellular Gal-3 was characterised as a sensor of vacuolar disruption that occurs when *Shigella flexneri* enters into host cell cytosol (Feeley et al., 2017; Paz et al., 2010). Other study demonstrated the role of Gal-3 in guiding mGBP2 and mGBP1 to PCVs (Feeley et al., 2017). Moreover, Gal-3 can mediate bactericidal functions and regulate inflammatory events, such as cytokines production (Chen, Weng, Hong, & Liu, 2014). However, no investigation has been performed to better understand the function of Gal-3 during *B. abortus* infection. In this study, our results demonstrate that Gal-3 is dispensable for BCV disruption as well as for inflammasome activation and pyroptosis. However, *B. abortus*-induced Gal-3 regulates the induction of proinflammatory mediators. Finally, our findings suggest that Gal-3 is important for *B. abortus* persistence both in vitro and in vivo.

2 | RESULTS

2.1 | *Brucella abortus* induces Gal-3 expression

Gal-3 is upregulated in several cells in response to stimuli like tissue damage and pathogens infections, such as *Francisella novicida* and *Salmonella spp* (Li et al., 2008; Mishra et al., 2013). In an effort to investigate the role of Gal-3 in innate immunity to *B. abortus*, Gal-3 expression and secretion were evaluated in C57BL/6 macrophages 2, 6 or 24 hr post infection. Infected macrophages showed higher levels of Gal-3 expression (Figure 1a) and secretion (Figure 1b) compared to non-infected macrophages at all times analysed.

Many invasive bacteria, such as *B. abortus*, utilise secretion systems to inject proteins involved in bacterial virulence into host cell cytosol (Alix, Mukherjee, & Roy, 2011; Feeley et al., 2017). The immune system is able to recognise and respond to structural/effector components of these secretion systems through receptors and cytosolic sensors (Vance et al., 2009). To better understand the role of the *B. abortus* type IV secretion system (T4SS) in Gal-3 expression, we also infected cells with the T4SS deficient *B. abortus* (Δ virB). Macrophages infected with *B. abortus* Δ virB showed reduced levels of Gal-3 expression (Figure 1c) and secretion (Figure 1d and Figure S1) compared to WT *B. abortus*. These data suggest the relevance of the *B. abortus* type IV secretion system for Gal-3 expression and secretion during *B. abortus* infection.

2.2 | Galectin-3 is required for optimal type I IFN responses

Previous reports have showed the role of galectins during inflammatory processes (Alves et al., 2013; Diaz-Alvarez & Ortega, 2017). In order to investigate whether Gal-3 is involved in the production of inflammatory cytokines during *Brucella* infection, we infected

C57BL/6 and Gal-3 KO macrophages with *B. abortus* for 24 hr for cytokine measurement. Our data show that absence of Gal-3 leads to decrease in *IFN- β* expression (Figure 2a) and CXCL10 production (Figure 2b), a signature cytokine of type I IFN response (Costa Franco et al., 2018). As a control of type I IFN independent cytokine, TNF- α

secretion was unaffected (Figure 2c). IFN receptor family uses signal transduction pathways that involve JAKs-STATs proteins. Previously, our group demonstrated that *B. abortus*-induced STAT-1 phosphorylation depends on type I IFN signalling (de Almeida et al., 2011). Thus, we evaluate STAT-1 phosphorylation in Gal-3 KO macrophages. We

FIGURE 1 *Brucella abortus* induces Galectin-3 expression depending on the type IV secretion system. Macrophages from C57BL/6 or Gal-3 KO mice were uninfected (NI) or infected with *B. abortus* (MOI 100:1). (a) qPCR was performed to determine *Galectin-3* gene expression 2 and 24 hr post infection. (b) Culture supernatants and lysates were harvested 2, 6 and 24 hr post infection and Galectin-3 was observed by western blot. β -Actin was used as control. Macrophages from C57BL/6 mice were uninfected (NI), infected with *B. abortus* WT or with the *Brucella* type IV secretion system mutant (Δ virB) and *Galectin-3* expression and production assessed by (c) qPCR at 24 hr post-infection and (d) western blot, respectively. Data are representative of three independent experiments. * $p < .05$ compared to NI, one-way ANOVA

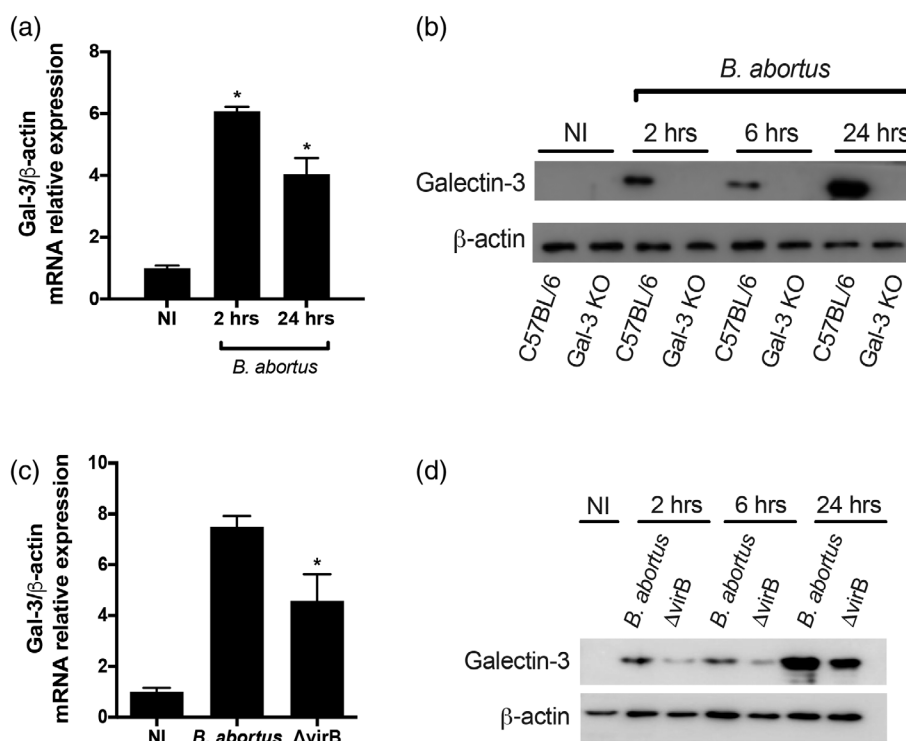
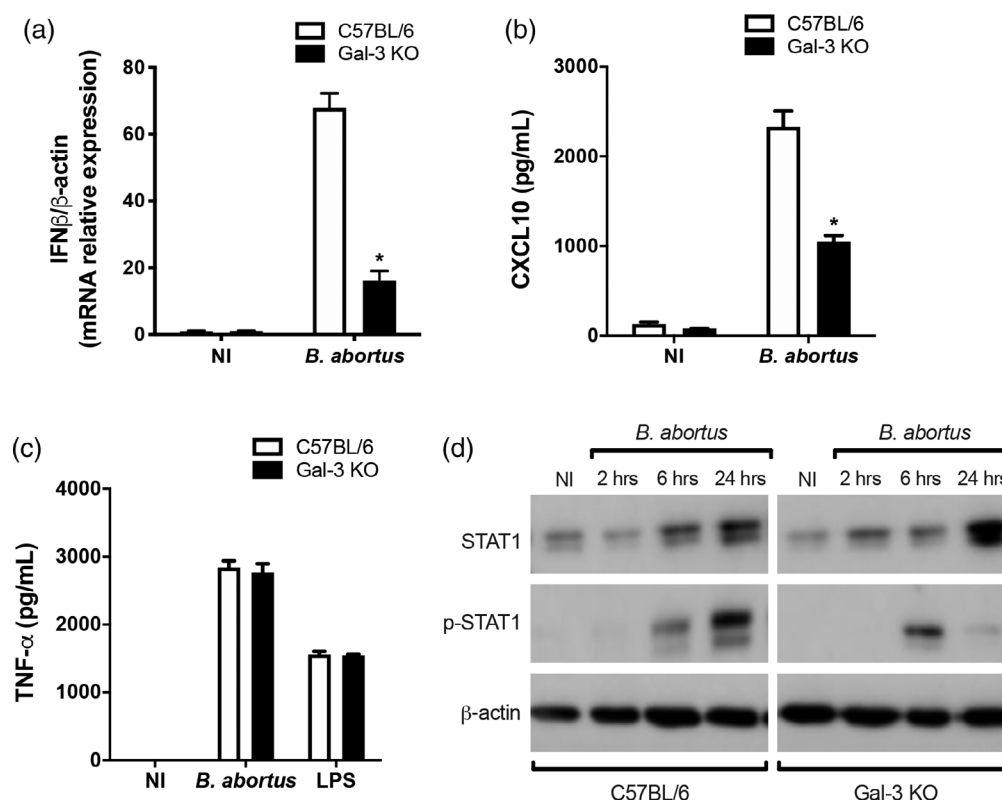


FIGURE 2 Galectin-3 regulates type I IFN responses. Macrophages from WT and Gal-3 KO mice were uninfected (NI) or infected with *B. abortus* (MOI 100:1). (a) qPCR was performed to determine *IFN- β* gene expression 24 hr post infection. Cell supernatants were harvested 24 hr post infection to determine (b) CXCL10 and (c) TNF- α by ELISA. (d) Cell lysates were harvested 2, 6 and 24 hr post infection, and STAT1 and p-STAT1-Tyr 701 expression determined by western blot, using β -Actin as control. Data are representative of three independent experiments. * $p < .05$ compared to wild type mice, two-way ANOVA



showed that, concomitantly with the decreased expression of type I IFN, Gal-3 KO cells infected with *B. abortus* showed reduced STAT-1 phosphorylation at 24 hr post infection compared to WT macrophages (Figure 2d). Collectively, these results suggest that Gal-3 plays an immunomodulatory role in the induction of type I IFN responses during *B. abortus* infection.

2.3 | Galectin-3 influences GBPs expression but is not required for vacuole disruption during *Brucella* infection

Type I IFNs induce the expression of a plethora of host resistance factors, including GBPs (Feeley et al., 2017; Kim et al., 2016; Pilla-Moffett, Barber, Taylor, & Coers, 2016). Previously studies from our group revealed that type I IFN is required for GBPs expression in *B. abortus* infected macrophages and that these molecules are involved in infection control (Costa Franco et al., 2018). To determine whether IFN- β reduction in Gal-3 KO cells could affect the expression of GBPs, we infected C57BL/6 and Gal-3 KO macrophages with *B. abortus* for 24 hr and evaluated GBPs mRNA. Gal-3-deficient cells infected with *B. abortus* showed reduced expression of GBPs 2, 3, 4 and 5 (Figure 3a) and diminished GBPs 2 and 5 protein levels (Figure 3b) compared to C57BL/6 infected macrophages. Furthermore, immunofluorescence analysis confirmed the lower GBP2 expression in infected Gal-3 KO cells compared to the control group (Figure 3c,d). Previous studies demonstrated that Gal-3 promotes the recruitment of GBP2 to the *Legionella* and *Yersinia* containing vacuoles (Coers, 2017; Feeley et al., 2017). Moreover, our group recently demonstrated that GBPs target the BCV, releasing bacterial molecules into the host cell cytosol (Costa Franco et al., 2018). Therefore, we evaluated whether Gal-3 is necessary for triggering BCV disruption using electron microscopy analysis. C57BL/6 macrophages showed 47.5% of disrupted BCVs, whereas Gal-3 KO cells showed 47.0% of disrupted BCVs (Figure 3e,f), suggesting that Gal-3 is not directly required for BCV disruption. Together, these findings suggest that Gal-3 is involved in the regulation of GBPs expression but is not required for BCV disruption during *B. abortus* infection.

2.4 | Galectin-3 does not facilitate inflammasome activation during *Brucella* infection

Bacterial components released from disrupted vacuoles possibly gain access to host cytosolic receptors, leading to inflammasome activation (Man et al., 2016). To address whether inflammasome activation requires Gal-3, macrophages from C57BL/6, Gal-3 KO and GBPchr3 KO were infected with *B. abortus* for 24 hr and IL-1 β secretion and caspase-1 activation were evaluated. C57BL/6 and Gal-3 KO infected macrophages secreted similar amounts of IL-1 β in response to *B. abortus*, whereas, as expected, GBPchr3-deficient cells showed reduced levels of IL-1 β compared to C57BL/6 (Figure 4a). Furthermore, macrophages from all mouse strains treated with nigericin, as

control (Cerqueira et al., 2018), released similar levels of IL-1 β (Figure 4b). Additionally, Gal-3 KO infected macrophages showed similar levels of pro-caspase-1, caspase-1 activation and pro-IL 1 β as infected cells from C57BL/6 mice. In contrast, GBPchr3-deficient macrophages showed diminished caspase-1 processing and pro-IL 1 β when compared to WT cells (Figure 4b).

Our group recently demonstrated that *B. abortus* induces pyroptosis resulting in macrophages death (Cerqueira et al., 2018). Thus, we assessed the requirement of Gal-3 during cell death induced by *B. abortus*. C57BL/6, Gal-3 KO and GBPchr3 KO macrophages were infected with *B. abortus* for 8 hr for LDH quantification in cell culture supernatants. A similar percentage of LDH was released from Gal-3 KO and C57BL/6 macrophages infected with *B. abortus*. However, GBPchr3 KO cells showed reduced percentage of LDH release compared to C57BL/6, confirming GBPchr3 involvement in pyroptosis during *Brucella* infection (Figure 4c). These results suggest that Gal-3 is dispensable for caspase-1 processing, IL-1 β secretion and pyroptosis following *B. abortus* infection.

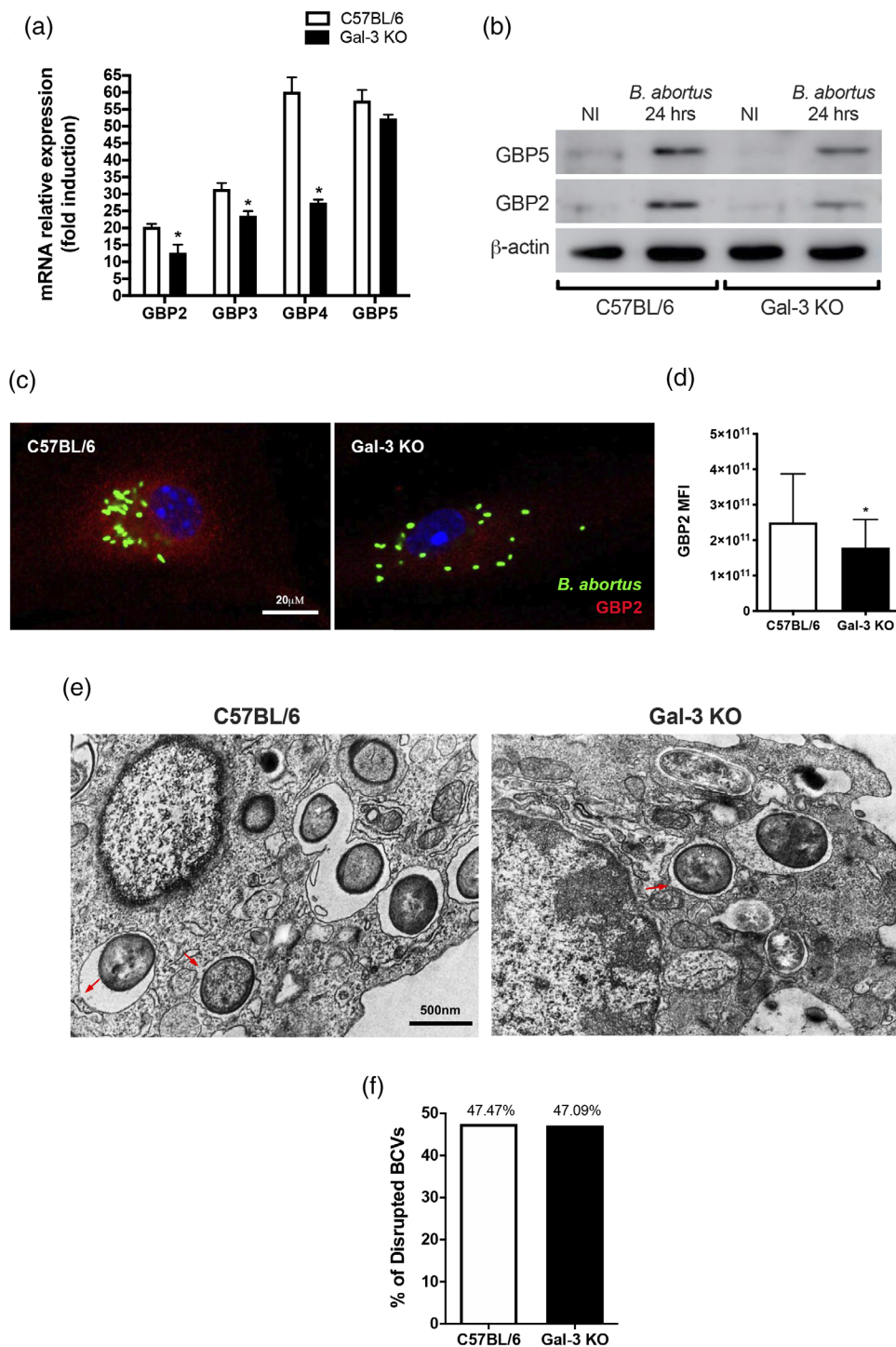
2.5 | Galectin-3 is necessary for efficient *B. abortus* replication in macrophages

Our data suggest that, despite not directly influencing BCV disruption and inflammasome activation, Gal-3 influences type I IFN responses following *B. abortus* infection in macrophages. Therefore, to determine the role of Gal-3 in *B. abortus* replication intracellularly, we measured *B. abortus* CFU in macrophages. Our findings showed no difference in bacterial counts at 2 and 6 hr between Gal-3 KO and WT cells following *Brucella* infection (Figure 5a), indicating that lack of Gal-3 does not influence bacterial entry in macrophages during the early infection phase. In contrast, 12 and 24 hr after infection, Gal-3 KO macrophages showed reduced bacterial load compared to C57BL/6 cells (Figure 5a). These data suggest that Gal-3 contributes to bacterial replication in macrophages. Furthermore, our group previously showed that type I IFN response elicited by *B. abortus* is detrimental to host infection control, since reduced bacterial numbers were found in type I IFN receptor knockout animals compared to wild-type mice (de Almeida et al., 2011). Therefore, since Gal-3 modulates type I IFN signalling, we evaluated the role of IFN responses in Gal-3 KO cells. Gal-3 KO macrophages treated with a mouse recombinant IFN- β showed unaltered *B. abortus* numbers in vitro at 2 and 6 hr post infection and enhanced *B. abortus* numbers at 12 and 24 hr post infection compared to IFN- β treated WT bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (Figure 5b), suggesting a role for Gal-3-induced IFN- β in *Brucella* replication.

2.6 | Lack of Gal-3 enhances host protection to *Brucella* infection

Since *B. abortus* infection enhances Gal-3 expression in macrophages, we hypothesize that *Brucella* was also able to induce Gal-3 expression

FIGURE 3 Galectin-3 influences GBPs expression but is not required for vacuole disruption during *Brucella* infection. Macrophages from WT and Gal-3 KO mice were uninfected (NI) or infected with *B. abortus* (MOI 100:1). (a) qPCR was performed to quantify GBP2, GBP3, GBP4 and GBP5 gene expression 24 hr post infection. (b) Cell lysates were obtained 24 hr post infection, and GBP2 and GBP5 production determined by western blot, β -Actin was used as control. (c) BMDMs obtained from WT and Gal-3 KO mice were infected with *B. abortus*-GFP (MOI 20:1) For 24 hr and analysed by confocal microscopy. Images are representative of the experiments performed. *Brucella*-GFP are shown in green, GBP2 is in red and DAPI (DNA) is in blue. Scale bar, 20 μ m. (d) GBP2 MFI in WT and Gal-3 KO macrophages infected with *B. abortus*. (e) Macrophages from WT and Gal-3KO mice were infected with *B. abortus* for 6 hr and ruptured BCVs containing *Brucella* were evaluated by TEM. The red arrows indicate regions of BCV membrane rupture. (f) Percentage of disrupted BCV containing bacteria was evaluated and is shown in the graph. Scale bar, 500 nm. (b) *B. abortus*. * $p < .05$ compared to wild-type mice, (a) two-way ANOVA, (d and f) student's t test



in vivo. To confirm that, we infected C57BL/6 mice with *B. abortus* and evaluated Gal-3 expression in spleen homogenates. Infected mice presented augmented levels of Gal-3 expression compared to uninfected (NI) mice (Figure 6a), demonstrating that *Brucella* also regulates Gal-3 in vivo. Furthermore, we investigated the role of Gal-3 in controlling *B. abortus* infection in mice. C57BL/6 and Gal-3 KO animals were infected with *B. abortus* and bacterial CFU in spleens were evaluated. As observed in Figure 6b, bacterial loads were reduced in Gal-3 KO mice compared to C57BL/6 animals at 1, 2 and 3 weeks

after infection. This result suggests that Gal-3 favours *B. abortus* infection, decreasing host resistance. Since Gal-3 KO mice were more resistant to *B. abortus* infection, we investigated the possible mechanisms involved in host protection. First, we analysed the production of inflammatory mediators in splenic cells from C57BL/6 and Gal-3 KO mice infected with *B. abortus*. Gal-3 KO mice presented elevated production of TNF- α (Figure 6c), IL-12 (Figure 6d) and IFN- γ (Figure 6e) compared to WT animals. Additionally, a decrease in the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 6f) and

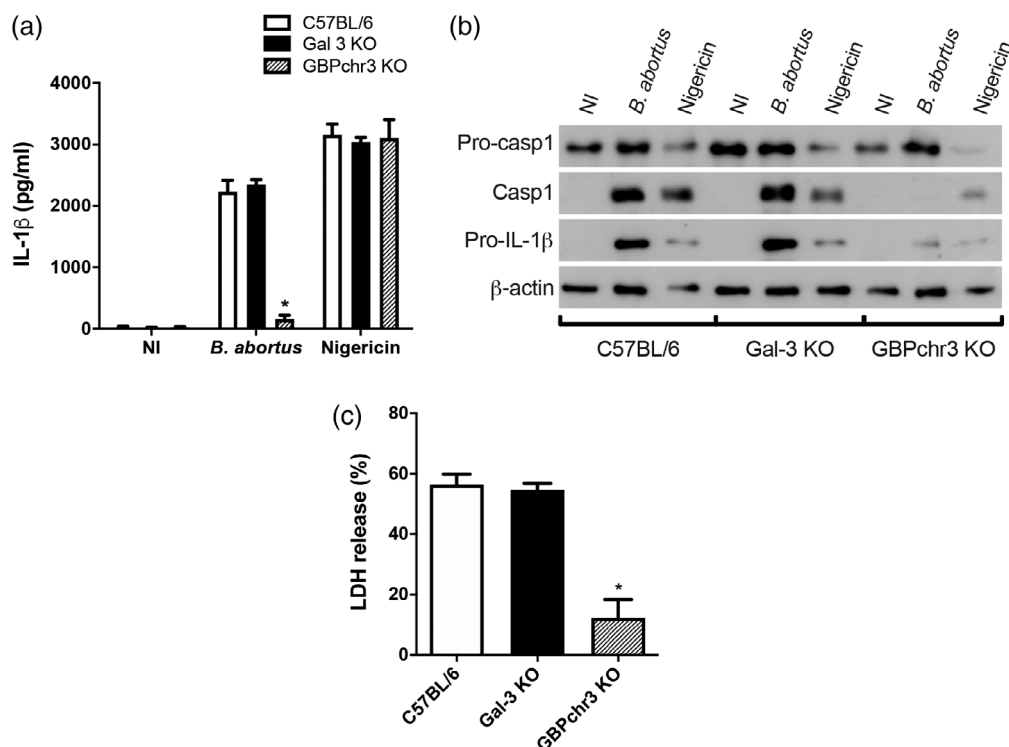


FIGURE 4 Caspase-1 processing, IL-1 β secretion and pyroptosis do not require Galectin-3. Macrophages from WT and Gal-3 KO mice were uninfected (NI) or infected with *B. abortus* (MOI 100:1). (a) BMDMs supernatants were collected 24 hr post infection to detect IL-1 β by ELISA assay. (b) Cell lysates were obtained at 24 hr post infection, and pro-IL-1 β (cell lysates), mature IL-1 β (supernatant) and caspase-1 were determined by western blot. β -Actin was used as loading control. (c) Macrophages obtained from WT and Gal-3 KO mice were infected with *B. abortus* and cell death was measured by LDH release in cell supernatants at 8 hr post infection. * $p < .05$ compared to wild-type mice, (a) two-way ANOVA and (c) one-way ANOVA

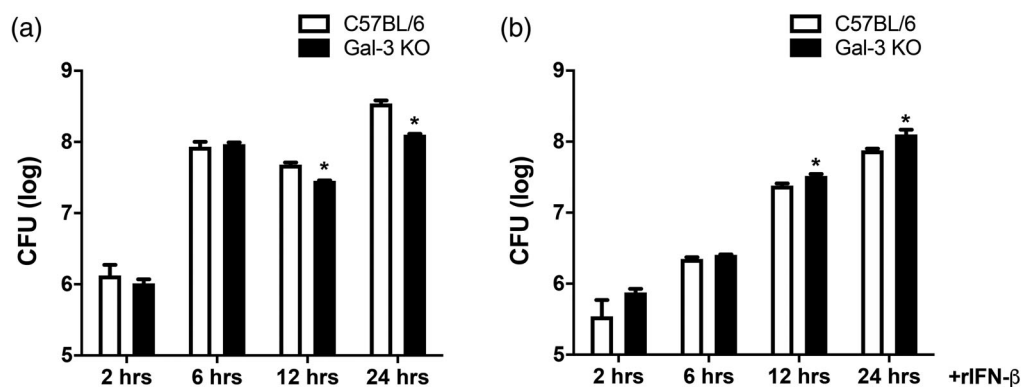


FIGURE 5 Galectin-3 is involved in *B. abortus* replication in macrophages. BMDMs from WT and Gal-3 KO mice were infected for 2 and 24 hr with *B. abortus*. (a) Macrophages were lysed 2, 6, 12 and 24 hr post infection and bacterial CFU counts were analysed. (b) BMDMs were also treated 24 hr prior to infection with 100 U/ml of a mouse recombinant IFN- β (rIFN- β). Macrophages were lysed 2, 6, 12 and 24 hr post infection and bacterial CFU counts were analysed. Data are representative of three independent experiments. * $p < .05$ compared to wild-type mice, student's t test

diminished expression of CXCL10 (Figure 6g) was observed in Gal-3 KO mice compared to control mice. Furthermore, Gal-3 KO animals also showed increased levels of NO (Figure 6h) compared to the WT group. To further evaluate the resistance profile of Gal-3 KO mice, we assessed the recruitment of immune cells populations in spleens.

C57BL/6 and Gal-3 KO mice were infected with *B. abortus* and the numbers of macrophages (CD11b⁺F4/80⁺), dendritic cells (CD11b⁺CD11c⁺) and neutrophils (CD11b⁺LY6G⁺) were analysed by flow cytometry. No differences were observed in the recruitment of immune cells in non-infected spleens from WT and Gal-3 KO mice.

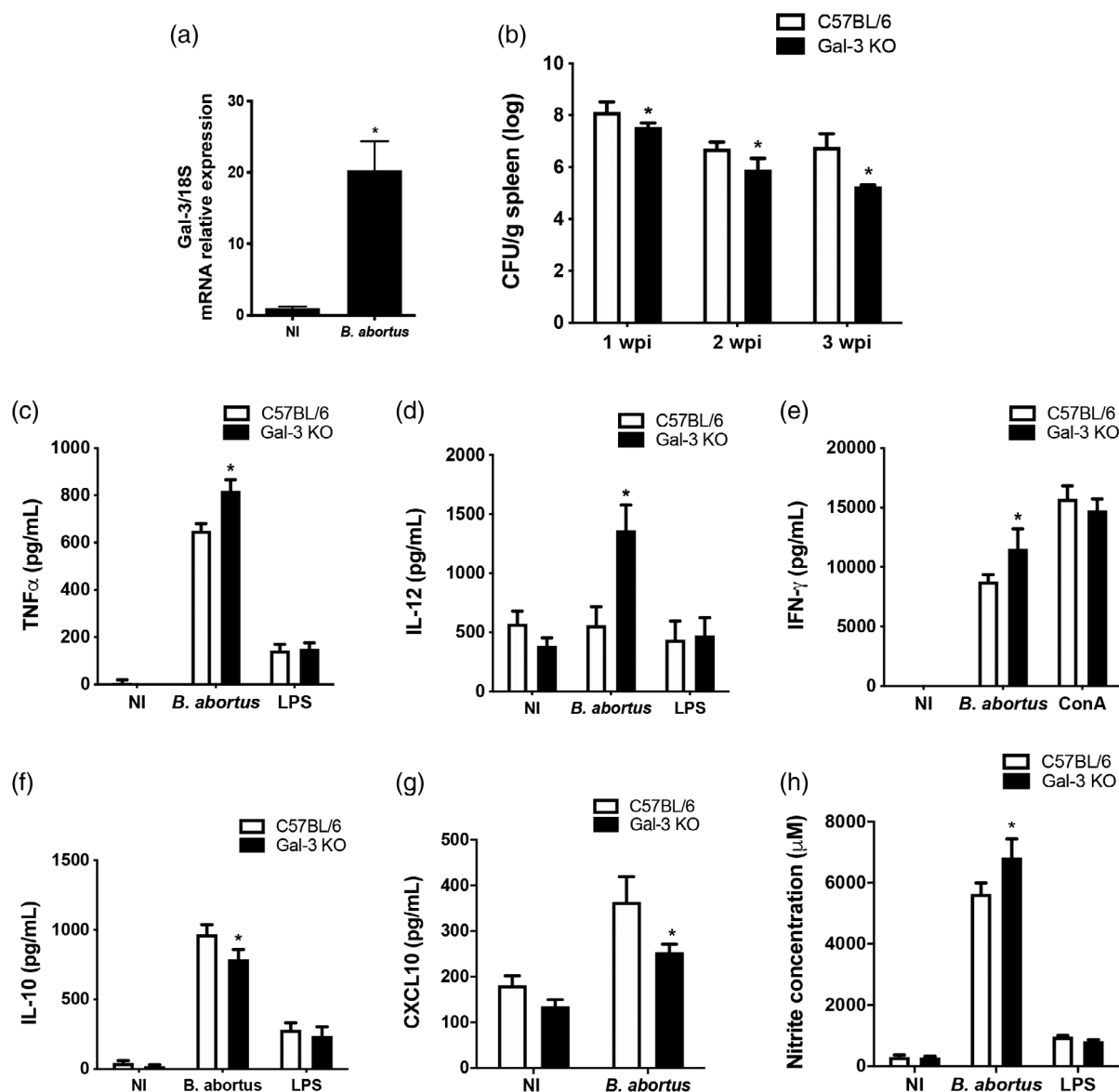


FIGURE 6 Lack of Galectin-3 enhances host resistance to *Brucella* infection. Spleen obtained from WT mice were uninfected (NI) or infected i.p. with 1×10^6 CFU of *B. abortus*. (a) qPCR was performed to determine *Galectin-3* gene expression 2 weeks post infection. (b) WT and Gal-3 KO animals were infected i.p. with 1×10^6 CFU of *B. abortus*. Mice were sacrificed at 1, 2 and 3 weeks post infection (wpi) for CFU determination in spleens. Splenocytes from infected WT and Gal-3 KO mice were cultured with *B. abortus* (MOI: 100), ConA (5 mg/ml) *E. coli* LPS (1 μg/ml) or medium alone for 24, 48 and 72 hr and (c) TNF-α, (d) IL-12, (e) IFN-γ, (f) IL-10 and (h) CXCL10 was measured by ELISA. (g) Nitric oxide production was measured by Griess reaction (mM) using the same stimuli described for cytokines. Data are representative of three independent experiments. * $p < .05$ compared to wild-type mice, (a) student's *t* test, (b–g) two-way ANOVA

However, a greater number of macrophages (Figure 7a), dendritic cells (Figure 7b) and neutrophils (Figure 7c) were observed in Gal-3 KO mice compared to C57BL/6 mice. Furthermore, we tested the myeloperoxidase (MPO) activity in spleen cells homogenate from C57BL/6 and Gal-3 KO mice infected with *B. abortus* to corroborate with increased neutrophil recruitment. An increased MPO activity (Figure 7d) was observed in splenic homogenates from Gal-3 KO mice infected with *B. abortus* compared to control animals. Collectively, these findings suggest that induced expression of Gal-3 during *B. abortus* infection plays a detrimental role in restricting infection in mice by regulating inflammatory components that are necessary for

host protection in vivo and by limiting the recruitment of macrophages, dendritic cells and neutrophils.

3 | DISCUSSION

Gal-3 detects vacuolar rupture that implies pathogens actively entering the host cell cytosol (Paz et al., 2010). However, the role of Gal-3 during *B. abortus* infection was not investigated. In this study, we showed that *B. abortus* induces Gal-3 upregulation in macrophages and mouse spleens, corroborating previous studies showing that

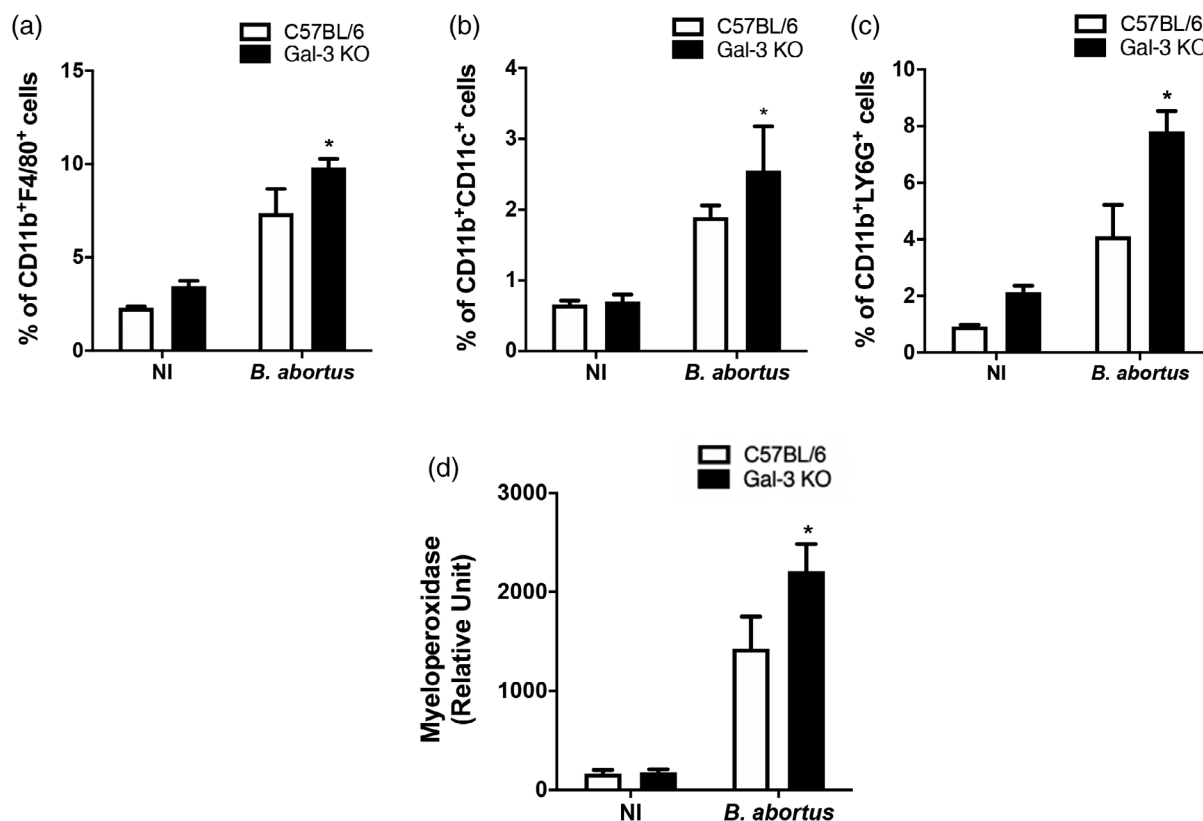


FIGURE 7 Galectin-3 regulates innate immune cells recruitment. WT and Gal-3 KO mice were infected with 1×10^6 CFU of *B. abortus* intraperitoneally. Splenocytes from WT and Gal-3 KO mice were stained for flow cytometry analysis. Spleen cells were stained for (a) CD11b⁺ F4/80⁺, (b) CD11b⁺ CD11c⁺, and (c) CD11b⁺ Ly6G⁺. (d) Splenic homogenates from both mouse groups infected with *B. abortus* were measured for myeloperoxidase (MPO) activity. Graphs are representative of three independent experiments. * $p < .05$ compared to wild-type mice, two-way ANOVA

Gal-3 expression is increased in response to pathogen infections in different cell types and tissues (Diaz-Alvarez & Ortega, 2017). To determine the role of *B. abortus* type IV secretion system for Gal-3 expression, we infected macrophages with the type IV secretion system deficient *B. abortus* (Δ virB) and observed that the T4SS is important for full Gal-3 expression. However, it is possible that this could be also related to different intracellular localization or replication of bacteria at these time-points and further experiments are needed to confirm the T4SS role in inducing Gal-3 expression.

Corroborating our data, a recent study showed that bacterial secretion system is important for the recruitment of Gal-3 to *Legionella*-containing vacuole (LCV) (Feeley et al., 2017). Indeed, secretion system is important for the injection of bacterial proteins into host cell cytosol (Celli, 2015), and for disruption of the membrane of PCVs (Chen et al., 2014; Liehl, Zuzarte-Luis, & Mota, 2015).

Interaction of Gal-3 with pathogens can influence the inflammatory process and its role in the infection depends on different factors, such as direct association with the pathogen, extracellular binding to membrane receptors or modulating the activity of intracellular proteins (Diaz-Alvarez & Ortega, 2017). Here in, we observed that Gal-3 regulates the type I IFN responses following *B. abortus* infection. Our data revealed that Gal-3 KO macrophages infected with *B. abortus*

diminished *IFN- β* mRNA transcripts and CXCL10 production when compared to WT cells. Notably, several studies have reported the variable role of type I IFNs in response to bacterial infections (Boxx & Cheng, 2016; Kovarik, Castiglia, Ivin, & Ebner, 2016; McNab, Mayer-Barber, Sher, Wack, & O'Garra, 2015). Recently, Maier et al. (2016) demonstrated that type I IFN contributes to the resistance during lung infection with *S. pneumoniae* and the susceptibility of IFNAR KO mice to this infection has been associated with higher bacterial burden and lung tissue damage when compared to control. In contrast, type I IFN pathway is detrimental for *L. monocytogenes* infection control as IFNAR KO animals showed reduced *L. monocytogenes* numbers in the liver when compared to wild-type mice (de Almeida et al., 2011; Rayamajhi, Humann, Penheiter, Andreasen, & Lenz, 2010). In the *Brucella* infection model, our group has showed that type I IFN pathway is detrimental to the host and resistance of IFNAR KO mice has been accompanied by lower bacterial burden and by augmented *IFN- γ* and NO secretion in spleen cells when compared to control mice (de Almeida et al., 2011). Herein, we observed that Gal-3 is detrimental to *B. abortus* infection restriction since reduced bacterial numbers were found in Gal-3 KO macrophages when compared to WT cells. Furthermore, we demonstrated that Gal-3 KO macrophages treated with mouse recombinant *IFN- β* showed enhanced *B. abortus* CFU

in vitro indicating a detrimental role of Gal-3-induced IFN- β in *Brucella* replication. Previous data showed that *B. abortus* induces IRF3 signaling resulting in STAT1 phosphorylation and IFN- β production in macrophages (de Almeida et al., 2011). Here, we observed that concomitant with the decrease of IFN- β , Gal-3 KO macrophages infected with *B. abortus* showed reduced STAT-1 phosphorylation compared to WT cells. In this context, we suggest that Gal-3 can be detrimental to *B. abortus* infection control and one possible mechanism could be by inducing type I IFN responses.

Type I IFNs act regulating gene products that are involved in inflammation (Decker, Muller, & Stockinger, 2005; Kovarik et al., 2016). In this pathway, several host resistance factors are activated, including IRGs and GBPs (Kim et al., 2016; Pilla et al., 2014). Our group recently demonstrated that *B. abortus* infection induces the formation of GBP2 aggregates located in close proximity to BCVs and that GBPs machinery is important to BCV disruption (Costa Franco et al., 2018). The mechanisms by which GBPs target pathogens-containing vacuoles remain poorly characterised; however, previous studies have demonstrated that Gal-3 is critical for delivering mGBP2 to *Legionella*- and *Yersinia*-containing vacuoles (Feeley et al., 2017; M. T. R. Gomes et al., 2019). In this work, we demonstrated that Gal-3 is not directly needed for BCV disruption during *B. abortus* infection. Gal-3 mediated recognition of PVs is not the only mechanism by which the host cell can transfer GBPs to vacuoles. For example, the recruitment of GBPs to *Chlamydia* and *Toxoplasma* vacuoles requires IFN- γ -induced GTPases Irgm1 and Irgm3 (Feeley et al., 2017; Haldar et al., 2013; Haldar et al., 2015; Herrou et al., 2019). Thus, in the context of *B. abortus* infection, future strategies should be taken to elucidate the mechanisms by which the host cells can carry GBPs to BCVs independently of Gal-3.

Bacterial components released from disrupted vacuoles enable greater access to host cytosolic sensors, leading to inflammasome activation (Eren et al., 2020; Man et al., 2016). In this context, our group recently demonstrated that inflammasome activation and pyroptosis are important for *B. abortus* infection control and this process requires functionally active GBPs (Cerqueira et al., 2018; Costa Franco et al., 2018). In this work, we demonstrated that Gal-3 is dispensable for inflammasome activation and pyroptosis in *Brucella* infected macrophages. Although, Gal-3 and GBPs can form protein complexes which associate with PVs (Feeley et al., 2017); here, we demonstrated that during *Brucella* infection, BCV disruption, inflammasome activation and pyroptosis occur independently of Gal-3. The possibility of functional redundancy between Gal-3 and other molecules, which can also delivery GBPs to PVs (Coers, 2017; Feeley et al., 2017; Pilla et al., 2014) may explain why Gal-3 KO macrophages showed similar levels of inflammasome activation and pyroptosis when compared to cells from WT mice during *B. abortus* infection.

Previous studies demonstrated that Gal-3 can be detrimental to the host, modulating the inflammatory components necessary for the protection and infection restriction (Li et al., 2008; Norling, Perretti, & Cooper, 2009; Quattroni et al., 2012; Weng et al., 2018). Li et al.

(Li et al., 2008) demonstrated that Gal-3 KO mice were less susceptible to *Salmonella* infection, and this resistance phenotype has been correlated with low numbers of bacterial CFU in spleens and higher induction of proinflammatory cytokines and NO production. In a *Toxoplasma gondii* infection model, dendritic cells from Gal-3-deficient mice produce higher IL-12 amounts and consequently induce a robust Th1-polarised response when compared to dendritic cells from WT animals (Bernardes et al., 2006). In our study, we observed that Gal-3 is detrimental to *B. abortus* infection control also in vivo. The analysis of bacterial burden showed that Gal-3 KO mice harboured decreased numbers of *Brucella* in spleens compared to WT mice at 1, 2 and 3 weeks post infection, corroborating our in vitro data. Indeed, we showed that spleen cells from *Brucella*-infected Gal-3 KO mice secreted higher levels of IFN- γ , TNF- α , IL-12 and NO, critical components to *Brucella* infection control. Additionally, reduced levels of IL-10 were detected. Indeed, there is growing evidence demonstrating a correlation between type I IFN and type II IFN pathways. IFN- β produced by cells following *L. monocytogenes* infection down regulated the IFN- γ receptor, reducing responsiveness of cells to IFN- γ and, consequently, the infection restriction (Rayamajhi et al., 2010; Souza et al., 2020). Herein, we demonstrated that spleen cells from *Brucella*-infected Gal-3 KO mice secreted higher levels of IFN- γ and reduced amounts of CXCL10 when compared to *Brucella*-infected WT mice. This can be an evidence that corroborates with this cross-talk between type I IFN and type II IFN pathways and can partially explain the detrimental effect of type I IFN pathway during *B. abortus* infection (de Almeida et al., 2011). However, future studies should be performed to confirm this hypothesis.

Additionally, we showed that Gal-3 KO mice presented a greater number of neutrophils, dendritic cells and macrophages compared to C57BL/6 mice. The higher recruitment of leukocytes in Gal-3 KO spleens may correlate with lower numbers of bacterial CFU in mouse organ. Recently, it was demonstrated that Gal-3 induced during sepsis is deleterious and inhibits neutrophil migration that facilitates bacterial spread (Ferreira et al., 2018). Gal-3 KO animals presented low numbers of bacterial CFU in the blood and peritoneal exudate, besides a higher recruitment of neutrophils to the local of infection in a model of sepsis (Ferreira et al., 2018). Previously, we showed that increased *Brucella* burden observed in Caspase11 and Gasdermin-D KO mice was related to deficiency in neutrophils, macrophages and dendritic cells recruitment and activation (Cerqueira et al., 2018). Further, neutrophil depletion from infected wild-type animals revealed that lack of neutrophils diminished mouse resistance to *Brucella* infection (Cerqueira et al., 2018).

In summary, our findings suggest that Gal-3 induced during *B. abortus* infection plays a detrimental role in restricting bacterial replication. Here, we demonstrated that Gal-3 acts limiting the recruitment of immune cells to the infection site, regulating inflammatory components such as proinflammatory cytokines and NO that are necessary for host protection in vivo. Finally, lack of Gal-3 modulates the type I IFN responses that may be beneficial to the persistence of *Brucella* infection.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Mice

Wild-type (WT) C57BL/6 animals were provided from animal facility of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Gal-3 KO (Hsu et al., 2000) and GBPchr3 KO (Yamamoto et al., 2012) mice were described previously and generated in the C57BL/6 background. Six to eight weeks of age mice were maintained in isolators at UFMG as previously described (Cerqueira et al., 2018). The experiments were preapproved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Minas Gerais under permit # 165/2019.

4.2 | Cell culture

Bone marrow cells were harvested from femora and tibia of C57BL/6, Gal-3 KO and GBPchr3 KO mice and derived in macrophages (BMDMs) as previously described (Carvalho et al., 2015; Costa Franco et al., 2018; M. T. Gomes et al., 2013). Bone marrow cells were harvested and differentiated with 20% L-929 cell-conditioned medium. Before infection, macrophages were seeded onto 24-well plates at the density of 5×10^5 cells per well or 1×10^5 cells per well over a sterile coverslip (for microscopy analysis) as previously described (Costa Franco et al., 2018). Macrophages were infected with *B. abortus* strain 2,308, virB2 mutant strain or *Brucella*-GFP at indicated multiplicity of infection (MOIs) in the figure legends.

4.3 | *Brucella* strains

The *Brucella* strains used in this study are *B. abortus* virulent strain S2308, a variant that constitutively expresses GFP and virB2 (Δ virB) mutant strain obtained from our laboratory as previously described (Guimaraes et al., 2019).

4.4 | *Brucella abortus* infection in vitro

BMDMs were infected in vitro with virulent *B. abortus* strain 2,308 or virB2 mutant strain at an MOI of 100:1 in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 hr as previously described (Guimaraes et al., 2019). In confocal microscopy experiments, BMDMs were infected with *B. abortus*-GFP at an MOI of 20:1 (Guimaraes, Martins, Gomes, Cerqueira, & Oliveira, 2020).

4.5 | Real-time RT-PCR

For gene expression analysis, total RNA from BMDMs was extracted using the TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instruction. RNA was reverse transcribed (1 mg of total RNA) using Illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare, Chicago,

IL) as previously shown (Guimaraes et al., 2019). The PCR reaction was performed with QuantStudio3 real-time PCR instrument (Applied Biosystems) as previously described (Guimaraes et al., 2019). The primers were used to amplify a specific fragment corresponding to specific gene target: β -actin, forward, 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3', reverse, 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'; Galectin-3, forward, 5'-CAG GAA AAT GGC AGA CAG CTT-3', reverse, 5'-CCC ATG CAC CCG GAT ATC-3'; IFN- β , forward, 5'-GCC TTT GCC ATC CAA GAG ATG C-3', reverse, 5'-ACA CTG TCT GCT GGT GGA GTT C-3'; GBP2, forward, 5'-CTG CAC TAT GTG ACG GAG CTA-3', reverse, 5'-CGG AAT CGT CTA CCC CAC TC-3'; GBP3, forward, 5'-CTG ACA GTA AAT CTG GAA GCC AT-3', reverse, 5'-CCG TCC TGC AAG ACG ATT CA-3'; GBP4, forward, 5'-GGA GAA GCT AAC GAA GGA ACA A-3', reverse, 5'-TTC CAC AAG GGA ATC ACC ATT TT-3'; GBP5, forward, 5'-CTG AAC TCA GAT TTT GTG CAG GA-3', reverse, 5'-CAT CGA CAT AAG TCA GCA CCA G-3'. The results are presented as relative expression units after normalisation to the β -actin gene. The experiments were conducted in triplicate.

4.6 | Cytokine profile

Macrophages were plated at a density of 5×10^5 cells/well in 24-well plates. BMDMs were infected with *B. abortus* at an MOI of 100 for 24 hr as previously described (Guimaraes et al., 2020). Cells were also stimulated with 1 μ g/ml of *E. coli* LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 4 hr and with 20 μ M nigericin sodium salt (Sigma-Aldrich) for 30 min or stimulated with 1 μ g/ml of *E. coli* LPS for 24 hr (Cerqueira et al., 2018). After 24 hr, supernatants from cell culture were harvested and assayed for the production of murine IL-1 β , CXCL10 and TNF- α by ELISA (R&D Systems), according to manufacturer's directions and as previously demonstrated (Guimaraes et al., 2019).

4.7 | Western blot analysis

Macrophages were plated at a density of 5×10^5 cells/well in 24-well plates and infected with *B. abortus* or virB2 mutant strain at an MOI of 100 for 2, 6 and 24 hr. Cells were also stimulated with 1 μ g/ml of *E. coli* LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 4 hr and cultured with 20 μ M nigericin sodium salt Sigma-Aldrich) for 30 min as positive control. Cell supernatants were collected and cells were lysed with M-PER protein extraction reagent (Thermo Scientific) supplemented with 1:100 protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich) as previously demonstrated (Cerqueira et al., 2018). Concentration of proteins was determined using BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Equal amounts of protein were loaded onto sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and transferred (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) in transfer buffer (50 mM Tris, 40 mM glycine, 10% methanol) to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) as previously described (Silveira et al., 2017). After transfer, membranes were blocked for 1 hr in TBS with 0.1% Tween-20 containing 5% non-fat dry milk and washed 3 times for 10 min with TBS with 0.1%

Tween-20. Subsequent to washing, the membranes were incubated overnight with 1:1,000 primary antibodies at 4°C. Primary antibodies included a mouse monoclonal against Gal-3 (no. A3A12; ThermoFisher Scientific); rabbit mAb β -actin (no. 4970; Cell Signalling Technology); anti-Caspase-1 (p20, mouse mAb no. AG-20B0042; Adipogen), anti-GBP2 (no.11854-1 AP; Proteintech®); anti-GBP5 (no.13220-1 AP; Proteintech®); phospho-STAT1 (Y701) (rabbit mAb no. 58D6; Cell Signalling); total STAT1 (rabbit mAb no. 9172S Cell Signalling) and IL-1 β (mouse mAb no. 3A6; Cell Signalling Technology). Subsequently, membranes were incubated for 1 hr at room temperature with anti-rabbit IgG HRP-conjugated (no. 7074; Cell Signalling Technology) or anti-mouse IgG HRP conjugated (Cell Signalling Technology) Abs. Proteins were visualised using Luminol chemiluminescent HRP substrate (EMD Millipore) in an Amersham Imager 600 (GE Healthcare) as previously shown (Costa Franco et al., 2018). Densitometry analysis was performed using ImageJ software and band intensities were normalised to β -actin. Data were obtained relative to the level of macrophages infected with *B. abortus* for 24 hr assigned arbitrarily with the value of 1.0 as previously described (Silveira et al., 2017).

4.8 | Lactate dehydrogenase release assay

Macrophages were plated into 24-well plates (5×10^5 cells/well) and infected with *B. abortus* at a MOI of 100. *Brucella* infections were performed in DMEM media lacking phenol red as previously described (Cerqueira et al., 2018). After 8 hr of infection, supernatants were harvested for analysis of lactate dehydrogenase (LDH) release by dying cells. For determination of total LDH, cultures were lysed with Triton X-100. LDH was measured using the CytoTox 96 LDH-release kit (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's directions.

4.9 | Nitric oxide production

To assess nitric oxide (NO) production, WT and Gal-3 KO splenocytes from animals infected with *B. abortus* were cultured with a MOI of 100 bacteria or 1 mg/ml *Escherichia coli* LPS in a total volume of 200 μ l of medium/well. Then, cell supernatants were assayed for accumulation of nitrite (NO₂), using Griess reagent as previously described (Campos et al., 2019). NO₂ concentration was determined by comparison with a sodium nitrite, NaNO₂, (Sigma) standard curve.

4.10 | Confocal microscopy

For confocal microscopy, WT and Gal-3 KO BMDMs were seeded onto 24 wells containing glass coverslips at the density of 1×10^5 cells per well and macrophages were infected with *B. abortus*-GFP at a MOI of 20:1 for 24 hr. Then, macrophages were fixed with 4% paraformaldehyde (pH 7.4) for 30 min at room temperature and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 15 min as previously shown (Guimaraes et al., 2019). After fixed, cells were

washed and blocked for 1 hr with 1% BSA in PBS at room temperature prior to incubation with anti-GBP2 (no.11854-1 AP; Proteintech®) antibody at 4°C overnight. Anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor 546 was used for detection. At least three coverslips were analysed per sample and representative images were taken using an $\times 40$ objective using a Nikon A1 confocal microscope as previously demonstrated (Costa Franco et al., 2018). The mean fluorescence intensity (MFI) GBP2 positive staining was quantified per whole cell and reflects mean fluorescence intensity $\times$ cell area and was assessed using ImageJ Software.

4.11 | Transmission electron microscopy

Macrophages (1×10^7) from WT and Gal-3 KO mice were seeded infected with *B. abortus* (MOI of 100:1) for 6 hr. Briefly, cells were then fixed with glutaraldehyde (2.5% in 1 M phosphate buffer) for 24 hr at 4°C, washed and sent to the Center of Microscopy at UFMG for transmission electron microscopy (TEM) analysis. To count the percentage of ruptured BCV membranes, we evaluated 30 macrophages per group as previously described (Costa Franco et al., 2018). Each macrophage was evaluated in relationship to the total number of bacteria in $\times 14,500$ magnification. Further, membrane integrity of each BCV was carefully analysed in a higher magnification ($\times 60,000$). Then, we calculated the percentage of ruptured BCVs in relationship to the total number of bacteria counted as previously demonstrated by our group (Costa Franco et al., 2018).

4.12 | Measurement of *Brucella* CFU

C57BL/6 and Gal-3 KO ($n = 5$ animals) were infected i.p. with 1×10^6 CFU *B. abortus* strain S2308 and sacrificed at 1, 2 or 3 weeks post infection. To measure *Brucella* CFU, the spleens extracted from the animals were macerated in 10 ml of sterile saline solution (NaCl 0.9%) using a steel sieve and plated on Brucella broth agar and after 3 days, the number of CFU was counted as described previously (Khan et al., 2020). To measure intracellular multiplication in macrophages, macrophages were plated onto 24-well plates at the density of 5×10^5 cells per well. Cells were then infected at a MOI of 100, and macrophages lysed to count *B. abortus* after 2, 6, 12 and 24 hr of infection as previously shown (Cerqueira et al., 2018). To address the role of type I IFN cells were treated 24 hr prior to infection with 100 U/ml of a mouse rIFN- β (Millipore, Burlington, MA) (Guimaraes et al., 2019). Cell lysates were plated on Brucella broth (BB) agar plates and incubated for 3 days at 37°C before CFU counting.

4.13 | Splenocyte cultures

C57BL/6 and Gal-3 KO ($n = 5$ animals) were infected i.p. with 1×10^6 CFU *B. abortus* strain S2308 and sacrificed at 2 weeks post infection as previously demonstrated (Cerqueira et al., 2018).

Splenocytes were obtained and the cells were adjusted to 1×10^6 cells in a 96-well plate. Then, spleen cells were stimulated with *B. abortus* strain S2308 at an MOI of 100:1, *Escherichia coli* LPS (1 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or concanavalin A (5 µg/ml) as positive controls and unstimulated cells were used as negative control as described previously (M. T. Gomes et al., 2016). Following 12, 24 or 72 hr of culture, IL-12, TNF- α , IL-10, CXCL10/IP-10 and IFN- γ levels were measured in the cell supernatants by ELISA, using the DuoSet kit (R&D Systems) as previously shown (de Paula, Marinho, Fahel, & Oliveira, 2017).

4.14 | Flow cytometry

For cytometry analysis, C57BL/6 and Gal-3 KO ($n = 5$ animals) were infected i.p. with 1×10^6 CFU *B. abortus* strain S2308 and sacrificed at 2 weeks post infection. Splenocytes were adjusted to 1×10^6 cells and they were incubated with anti-CD16/CD32 (FcBlock) (1,30 diluted in PBS/BSA) for 20 min at 4°C as previously described (Cerqueira et al., 2018). The cells were then washed in PBS/BSA and incubated for 20 min at 4°C with a mixture of the following antibodies: rat IgG2a anti-murine F4/80 conjugated to biotin (clone BM8; 1:200); rat IgG2b anti-murine CD11b conjugated to APC-Cy7 (clone M1/70; 1:200); hamster IgG1 anti-murine CD11c conjugated to FITC (clone HL3; 1:200); rat IgG2a anti-murine Ly-6G conjugated to PE (clone 1A8; 1:200) and rat IgG2a anti-murine CD62L conjugated to APC (clone MEL-14; 1:400). All reagents were purchased from BD Bioscience. Splenocytes were then washed again with PBS/BSA and incubated with streptavidin conjugated to PerCP Cy5.5 (1,30) for 20 min at 4°C (Marinho et al., 2020). After, 100,000 events were counted using Attune Acoustic Focusing flow cytometer (Life Technologies, Carlsbad, CA) and the results analysed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

4.15 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA) using two-way ANOVA, one-way ANOVA or Student's *t* test as indicated in the figure legends, $p < .05$.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: Fernanda Tana, Erika S. Guimarães and Sergio C. Oliveira; Funding Acquisition: Sergio C. Oliveira; Investigation: Fernanda Tana, Erika S. Guimarães, Daiane M. Cerqueira, Priscila C. Campos, Marco Tulio R. Gomes, Fabio V. Marinho; Validation: Fernanda Tana, Erika S. Guimarães; Writing Original Draft: Fernanda Tana, Erika S. Guimarães and Sergio C. Oliveira; Writing-Review and Editing: Fernanda Tana, Erika S. Guimarães and Sergio C. Oliveira.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

ORCID

Fernanda L. Tana  <https://orcid.org/0000-0002-4692-0836>

Erika S. Guimarães  <https://orcid.org/0000-0002-1893-3592>

Daiane M. Cerqueira  <https://orcid.org/0000-0002-8051-3396>

Priscila C. Campos  <https://orcid.org/0000-0003-1789-3290>

Marco Túlio R. Gomes  <https://orcid.org/0000-0002-9701-0808>

Fábio V. Marinho  <https://orcid.org/0000-0001-6885-3438>

Sergio C. Oliveira  <https://orcid.org/0000-0003-4062-5577>

REFERENCES

- Alix, E., Mukherjee, S., & Roy, C. R. (2011). Subversion of membrane transport pathways by vacuolar pathogens. *The Journal of Cell Biology*, 195(6), 943–952. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105019>
- Alves, C. M., Silva, D. A., Azzolini, A. E., Marzocchi-Machado, C. M., Lucisano-Valim, Y. M., Roque-Barreira, M. C., & Mineo, J. R. (2013). Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of toxoplasma gondii. *Parasitology*, 140(2), 210–219. <https://doi.org/10.1017/S003182012001473>
- Archambaud, C., Salcedo, S. P., Lelouard, H., Devilard, E., de Bovis, B., Van Rooijen, N., ... Malissen, B. (2010). Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary Brucella infection. *European Journal of Immunology*, 40(12), 3458–3471. <https://doi.org/10.1002/eji.201040497>
- Atluri, V. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B., & Tsois, R. M. (2011). Interactions of the human pathogenic Brucella species with their hosts. *Annual Review of Microbiology*, 65, 523–541. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102905>
- Baldi, P. C., & Giambartolomei, G. H. (2013). Immunopathology of Brucella infection. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 8(1), 18–26. <https://doi.org/10.2174/1574891x11308010005>
- Bernardes, E. S., Silva, N. M., Ruas, L. P., Mineo, J. R., Loyola, A. M., Hsu, D. K., ... Roque-Barreira, M. C. (2006). Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *The American Journal of Pathology*, 168(6), 1910–1920. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050636>
- Boxx, G. M., & Cheng, G. (2016). The roles of type I interferon in bacterial infection. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.016>
- Campos, P. C., Gomes, M. T. R., Marinho, F. A. V., Guimaraes, E. S., de Moura Lodi Cruz, M. G. F., & Oliveira, S. C. (2019). Brucella abortus nitric oxide metabolite regulates inflammasome activation and IL-1 β secretion in murine macrophages. *European Journal of Immunology*, 49(7), 1023–1037. <https://doi.org/10.1002/eji.201848016>
- Carvalho, N. B., Oliveira, F. S., Marinho, F. A., de Almeida, L. A., Fahel, J. S., Bafica, A., ... Oliveira, S. C. (2015). Nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2) regulates type-1 cytokine responses to Mycobacterium avium but is not required for host control of infection. *Microbes and Infection*, 17(5), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.009>
- Celli, J. (2015). The changing nature of the Brucella-containing vacuole. *Cellular Microbiology*, 17(7), 951–958. <https://doi.org/10.1111/cmi.12452>
- Cerqueira, D. M., Gomes, M. T. R., Silva, A. L. N., Rungue, M., Assis, N. R. G., Guimaraes, E. S., ... Oliveira, S. C. (2018). Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to Brucella abortus infection. *PLoS Pathogens*, 14(12), e1007519. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007519>
- Chen, H. Y., Weng, I. C., Hong, M. H., & Liu, F. T. (2014). Galectins as bacterial sensors in the host innate response. *Current Opinion in Microbiology*, 17, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.006>

- Coers, J. (2017). Sweet host revenge: Galectins and GBPs join forces at broken membranes. *Cellular Microbiology*, 19(12), e12793. <https://doi.org/10.1111/cmi.12793>
- Collins, P. M., Bum-Erdene, K., Yu, X., & Blanchard, H. (2014). Galectin-3 interactions with glycosphingolipids. *Journal of Molecular Biology*, 426(7), 1439–1451. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.004>
- Costa Franco, M. M., Marim, F., Guimaraes, E. S., Assis, N. R. G., Cerqueira, D. M., Alves-Silva, J., ... Oliveira, S. C. (2018). *Brucella abortus* triggers a cGAS-independent STING pathway to induce host protection that involves guanylate-binding proteins and Inflammasome activation. *Journal of Immunology*, 200(2), 607–622. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700725>
- de Almeida, L. A., Carvalho, N. B., Oliveira, F. S., Lacerda, T. L., Vasconcelos, A. C., Nogueira, L., ... Oliveira, S. C. (2011). MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN- β induction in response to *Brucella abortus* infection. *PLoS One*, 6(8), e23135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023135>
- de Almeida, L. A., Macedo, G. C., Marinho, F. A., Gomes, M. T., Corsetti, P. P., Silva, A. M., ... Oliveira, S. C. (2013). Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and Immunity*, 81(5), 1654–1662. <https://doi.org/10.1128/IAI.01356-12>
- de Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1505–1517. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>
- de Paula, R. R., Marinho, F. V., Fahel, J. S., & Oliveira, S. C. (2017). Contribution of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) to control *Mycobacterium avium* infection. *Microbes and Infection*, 19(11), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.09.005>
- Decker, T., Muller, M., & Stockinger, S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nature Reviews. Immunology*, 5(9), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nri1684>
- Diaz-Alvarez, L., & Ortega, E. (2017). The many roles of Galectin-3, a multifaceted molecule, in innate immune responses against pathogens. *Mediators of Inflammation*, 2017, 9247574. <https://doi.org/10.1155/2017/9247574>
- Eren, E., Planes, R., Bagayoko, S., Bordignon, P. J., Chaoui, K., Hessel, A., ... Meunier, E. (2020). Irgm2 and Gate-16 cooperatively dampen gram-negative bacteria-induced caspase-11 response. *EMBO Reports*, 21(11), e50829. <https://doi.org/10.15252/embr.202050829>
- Feeley, E. M., Pilla-Moffett, D. M., Zwack, E. E., Piro, A. S., Finethy, R., Kolb, J. P., ... Coers, J. (2017). Galectin-3 directs antimicrobial guanylate binding proteins to vacuoles furnished with bacterial secretion systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9), E1698–E1706. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615771114>
- Ferreira, R. G., Rodrigues, L. C., Nascimento, D. C., Kanashiro, A., Melo, P. H., Borges, V. F., ... Alves-Filho, J. C. (2018). Galectin-3 aggravates experimental polymicrobial sepsis by impairing neutrophil recruitment to the infectious focus. *The Journal of Infection*, 77(5), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.010>
- Fritsch, K., Mernberger, M., Nist, A., Stiewe, T., Brehm, A., & Jacob, R. (2016). Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex. *BMC Cancer*, 16, 502. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2546-0>
- Giambartolomei, G. H., Zwerdling, A., Cassataro, J., Bruno, L., Fossati, C. A., & Philipp, M. T. (2004). Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *Journal of Immunology*, 173(7), 4635–4642. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4635>
- Gomes, M. T., Campos, P. C., de Almeida, L. A., Oliveira, F. S., Costa, M. M., Marim, F. M., ... Oliveira, S. C. (2012). The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 130. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00130>
- Gomes, M. T., Campos, P. C., Oliveira, F. S., Corsetti, P. P., Bortoluci, K. R., Cunha, L. D., ... Oliveira, S. C. (2013). Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. *Journal of Immunology*, 190(7), 3629–3638. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202817>
- Gomes, M. T., Campos, P. C., Pereira Gde, S., Bartholomeu, D. C., Splitter, G., & Oliveira, S. C. (2016). TLR9 is required for MAPK/NF- κ B activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(5), 771–780. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0815-346R>
- Gomes, M. T. R., Cerqueira, D. M., Guimaraes, E. S., Campos, P. C., & Oliveira, S. C. (2019). Guanylate-binding proteins at the crossroad of noncanonical inflammasome activation during bacterial infections. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(3), 553–562. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0119-013R>
- Guimaraes, E. S., Gomes, M. T. R., Campos, P. C., Mansur, D. S., Dos Santos, A. A., Harms, J., ... Oliveira, S. C. (2019). *Brucella abortus* cyclic dinucleotides trigger STING-dependent unfolded protein response that favors bacterial replication. *Journal of Immunology*, 202(9), 2671–2681. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801233>
- Guimaraes, E. S., Martins, J. M., Gomes, M. T. R., Cerqueira, D. M., & Oliveira, S. C. (2020). Lack of Interleukin-6 affects IFN- γ and TNF- α production and early in vivo control of *Brucella abortus* infection. *Pathogens*, 9(12), 1040. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121040>
- Haldar, A. K., Foltz, C., Finethy, R., Piro, A. S., Feeley, E. M., Pilla-Moffett, D. M., ... Coers, J. (2015). Ubiquitin systems mark pathogen-containing vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), E5628–E5637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515966112>
- Haldar, A. K., Saka, H. A., Piro, A. S., Dunn, J. D., Henry, S. C., Taylor, G. A., ... Coers, J. (2013). IRG and GBP host resistance factors target aberrant, "non-self" vacuoles characterized by the missing of "self" IRGM proteins. *PLoS Pathogens*, 9(6), e1003414. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003414>
- Haudek, K. C., Spronk, K. J., Voss, P. G., Patterson, R. J., Wang, J. L., & Arnoys, E. J. (2010). Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.005>
- Herrou, J., Willett, J. W., Fiebig, A., Varesio, L. M., Czyz, D. M., Cheng, J. X., ... Crosson, S. (2019). Periplasmic protein EipA determines envelope stress resistance and virulence in *Brucella abortus*. *Molecular Microbiology*, 111(3), 637–661. <https://doi.org/10.1111/mmi.14178>
- Hsu, D. K., Yang, R. Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D. R., Fung-Leung, W. P., & Liu, F. T. (2000). Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *The American Journal of Pathology*, 156(3), 1073–1083. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64975-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64975-9)
- Khan, M., Harms, J. S., Liu, Y., Eickhoff, J., Tan, J. W., Hu, T., ... Smith, J. A. (2020). *Brucella* suppress STING expression via miR-24 to enhance infection. *PLoS Pathogens*, 16(10), e1009020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009020>
- Kieser, K. J., & Kagan, J. C. (2017). Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 17(6), 376–390. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.25>
- Kim, B. H., Chee, J. D., Bradfield, C. J., Park, E. S., Kumar, P., & MacMicking, J. D. (2016). Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense. *Nature Immunology*, 17(5), 481–489. <https://doi.org/10.1038/ni.3440>
- Kovarik, P., Castiglia, V., Ivin, M., & Ebner, F. (2016). Type I interferons in bacterial infections: A balancing act. *Frontiers in Immunology*, 7, 652. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00652>
- Li, Y., Komai-Koma, M., Gilchrist, D. S., Hsu, D. K., Liu, F. T., Springall, T., & Xu, D. (2008). Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-

- mediated inflammation. *Journal of Immunology*, 181(4), 2781–2789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2781>
- Liehl, P., Zuzarte-Luis, V., & Mota, M. M. (2015). Unveiling the pathogen behind the vacuole. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(9), 589–598. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3504>
- Macedo, G. C., Magnani, D. M., Carvalho, N. B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R. T., & Oliveira, S. C. (2008). Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *Journal of Immunology*, 180(2), 1080–1087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.1080>
- Maier, B. B., Hladik, A., Lakovits, K., Korosec, A., Martins, R., Kral, J. B., & Knapp, S. (2016). Type I interferon promotes alveolar epithelial type II cell survival during pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection and sterile lung injury in mice. *European Journal of Immunology*, 46, 2175–2186. <https://doi.org/10.1002/eji.201546201>
- Man, S. M., Karki, R., Sasai, M., Place, D. E., Kesavardhana, S., Temirov, J., ... Kanneganti, T. D. (2016). IRGB10 liberates bacterial ligands for sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes. *Cell*, 167(2), 382–396 e317. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.012>
- Marim, F. M., Franco, M. M. C., Gomes, M. T. R., Miraglia, M. C., Giambartolomei, G. H., & Oliveira, S. C. (2017). The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during *Brucella abortus* infection. *Seminars in Immunopathology*, 39(2), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0581-1>
- Marinho, F. V., Fahel, J. S., de Araujo, A., Diniz, L. T. S., Gomes, M. T. R., Resende, D. P., ... Oliveira, S. C. (2020). Guanylate binding proteins contained in the murine chromosome 3 are important to control mycobacterial infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(4), 1279–1291. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MA0620-526RR>
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews. Immunology*, 15(2), 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Mey, A., Leffler, H., Hmama, Z., Normier, G., & Revillard, J. P. (1996). The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *Journal of Immunology*, 156(4), 1572–1577.
- Mishra, B. B., Li, Q., Steichen, A. L., Binstock, B. J., Metzger, D. W., Teale, J. M., & Sharma, J. (2013). Galectin-3 functions as an alarmin: Pathogenic role for sepsis development in murine respiratory tularemia. *PLoS One*, 8(3), e59616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059616>
- Nio-Kobayashi, J. (2017). Tissue- and cell-specific localization of galectins, beta-galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anatomical Science International*, 92(1), 25–36. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0366-6>
- Norling, L. V., Perretti, M., & Cooper, D. (2009). Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. *The Journal of Endocrinology*, 201(2), 169–184. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0512>
- Paludan, S. R., & Bowie, A. G. (2013). Immune sensing of DNA. *Immunity*, 38(5), 870–880. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.004>
- Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., ... Sansonetti, P. (2010). Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cellular Microbiology*, 12(4), 530–544. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01415.x>
- Pilla, D. M., Hagar, J. A., Haldar, A. K., Mason, A. K., Degrandi, D., Pfeffer, K., ... Coers, J. (2014). Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), 6046–6051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321700111>
- Pilla-Moffett, D., Barber, M. F., Taylor, G. A., & Coers, J. (2016). Interferon-inducible GTPases in host resistance, inflammation and disease. *Journal of Molecular Biology*, 428(17), 3495–3513. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.032>
- Quattroni, P., Li, Y., Lucchesi, D., Lucas, S., Hood, D. W., Herrmann, M., ... Exley, R. M. (2012). Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells. *Cellular Microbiology*, 14(11), 1657–1675. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01838.x>
- Rayamajhi, M., Humann, J., Penheiter, K., Andreasen, K., & Lenz, L. L. (2010). Induction of IFN- α enables *listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), 327–337. <https://doi.org/10.1084/jem.20091746>
- Rodriguez, A. M., Delpino, M. V., Miraglia, M. C., & Giambartolomei, G. H. (2019). Immune mediators of pathology in Neurobrucellosis: From blood to central nervous system. *Neuroscience*, 410, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.018>
- Silveira, T. N., Gomes, M. T., Oliveira, L. S., Campos, P. C., Machado, G. G., & Oliveira, S. C. (2017). NLRP12 negatively regulates proinflammatory cytokine production and host defense against *Brucella abortus*. *European Journal of Immunology*, 47(1), 51–59. <https://doi.org/10.1002/eji.201646502>
- Souza, C., Sanches, R. C. O., Assis, N. R. G., Marinho, F. V., Mambelli, F. S., Morais, S. B., ... Oliveira, S. C. (2020). The role of the adaptor molecule STING during *Schistosoma mansoni* infection. *Scientific Reports*, 10(1), 7901. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64788-6>
- Tian, M., Lian, Z., Bao, Y., Bao, S., Yin, Y., Li, P., ... Yu, S. (2019). Identification of a novel, small, conserved hypothetical protein involved in *Brucella abortus* virulence by modifying the expression of multiple genes. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 349–362. <https://doi.org/10.1111/tbed.13028>
- Vance, R. E., Isberg, R. R., & Portnoy, D. A. (2009). Patterns of pathogenesis: Discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host & Microbe*, 6(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007>
- Vasta, G. R. (2009). Roles of galectins in infection. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(6), 424–438. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2146>
- Vasta, G. R. (2012). Galectins as pattern recognition receptors: Structure, function, and evolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 946, 21–36. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_2
- Weng, I. C., Chen, H. L., Lo, T. H., Lin, W. H., Chen, H. Y., Hsu, D. K., & Liu, F. T. (2018). Cytosolic galectin-3 and -8 regulate antibacterial autophagy through differential recognition of host glycans on damaged phagosomes. *Glycobiology*, 28(6), 392–405. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy017>
- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J. S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., ... Takeda, K. (2012). A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against toxoplasma gondii. *Immunity*, 37(2), 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.009>
- Yan, X. J., Yu, G. F., Jie, Y. Q., Fan, X. F., Huang, Q., & Dai, W. M. (2016). Role of galectin-3 in plasma as a predictive biomarker of outcome after acute intracerebral hemorrhage. *Journal of the Neurological Sciences*, 368, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.06.071>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Tana, F. L., Guimarães, E. S., Cerqueira, D. M., Campos, P. C., Gomes, M. T. R., Marinho, F. V., & Oliveira, S. C. (2021). Galectin-3 regulates proinflammatory cytokine function and favours *Brucella abortus* chronic replication in macrophages and mice. *Cellular Microbiology*, e13375. <https://doi.org/10.1111/cmi.13375>