

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DO RECEPTOR CLEC7A NO
RECONHECIMENTO IMUNE INATO DE *Neospora caninum***

Murilo Vieira da Silva

Uberlândia – MG

Dezembro – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DO RECEPTOR CLEC7A NO
RECONHECIMENTO IMUNE INATO DE *Neospora caninum***

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

MURILO VIEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO

Uberlândia – MG

Dezembro - 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586e
2013

Silva, Murilo Vieira da, 1988-

Efeito imunomodulatório do receptor CLEC7A no reconhecimento imune inato de *Neospora Caninum* / Murilo Vieira da Silva. – 2013.

98 p. : il.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Parasitologia - Teses. 3. Bovino - Parasito -
Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. II. Cunha Júnior, Jair Pereira da.
III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

À Deus,

**Pelos dons e oportunidades que me concedeu,
pela força e coragem para continuar na luta,
pelas amizades e amores que colocou no meu caminho.**

**Aos meus amados pais Gésio e Rosana pela vida,
amor, incentivo, apoio, cuidado e atenção.**

**Aos meus irmãos Gesileny e Paulo Vitor
Pelo amor, carinho e companheirismo.**

*“Se fiz descobertas valiosas, foi
mais por ter paciência do que
qualquer outro talento.”*

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me concedido a vida e por sempre estar comigo me dando forças para que eu possa alcançar todos os meus objetivos.

Ao Professor Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, meu orientador e mentor científico, por ter acreditado em mim e pelos valiosos ensinamentos, amizade e apoio nos momentos decisivos.

Aos demais professores do Laboratório de Imunoparasitologia - UFU, Dr. José Roberto Mineo, Dra Fernanda Maria Santiago, Dr Marcelo José Barbosa Silva, Dra Mônica Camargo Sopelete e a Dra Deise Aparecida de Oliveira Silva pela grande contribuição com ideias e auxílios durante a execução dos ensaios.

Aos amigos do laboratório que, de alguma forma, se fizeram presentes neste trabalho: Ana Carolina, Caroline, Cristina, Elivaine. Fernando Reis, Lourenço, Luciana Machado, Lydiane, Maraísa, Margareth Leitão, Miguel, Mylla, Nathâny Fernandes, Patrício, Silas, Tamires Lopes, Vanessa, e em especial ao Arlindo, Flávia, Eliezer e Kamila, o meu muito obrigado pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia: Ana Cláudia Arantes MarquezPajuaba, Edílge Maria de Gouveia, Marley Dantas Barbosa, Zilda Mendonça da Silva, pelo suporte a nós oferecido durante a realização do trabalho.

As secretárias do programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas Lucélia e Luceleide, e ao secretário do laboratório de Imunologia Max, pela atenção e dedicação.

A minha namorada Pollyanna, pelo carinho, amor, companheirismo, compreensão e paciência, sempre estando do meu lado e me apoiando em minhas decisões.

A toda minha Família, em especial aos meus pais: Gésio e Rosana, meus irmãos Gesileny e Paulo Vitor, e minhas avós que amo muito Ireni e Maria Inês, pois sem estes nada seria possível. Muito obrigado por tudo, por estarem ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Aos animais que participaram deste estudo, com todo o respeito e dignidade, sem a presença deles não seria possível alcançar os mesmos resultados.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPEMIG e MAPA que foram de fundamental importância para que esta pesquisa fosse desenvolvida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo Biológico de <i>Neospora caninum</i>	19
Figura 2. Sinalização via CLEC7A.....	27
Figura 3. Caracterização da expressão de CLEC7A em células do exsudado peritoneal de camundongos.....	42
Figura 4. Macrófagos CLEC7A ^{-/-} apresentam maior produção de diferentes citocinas quando incubados com taquizoítos de <i>N. caninum</i>	45
Figura 5. Células Dendríticas CLEC7A ^{-/-} apresentam maior produção de diferentes citocinas quando incubados com taquizoítos de <i>N. caninum</i>	46
Figura 6. Produção de IL-12p40 durante a fase aguda da infecção por <i>N. caninum</i>	47
Figura 7. Expressão da molécula co-estimulatória (CD80) em macrófagos incubados com taquizoítos de <i>N. caninum</i>	49
Figura 8. Expressão da molécula co-estimulatória (CD86) em macrófagos incubados com taquizoítos de <i>N. caninum</i>	50
Figura 9. Expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHCII) em macrófagos incubados com taquizoítos de <i>N. caninum</i>	51
Figura 10. Expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHCI) em macrófagos incubados com taquizoítos de <i>N. caninum</i>	52
Figura 11. Parasitismo <i>in vitro</i> em macrófagos WT e CLEC7A ^{-/-}	54
Figura 12. Parasitismo agudo em macrófagos peritoneais.....	55

Figura 13. Parasitismo crônico em camundongos CLEC7A ^{-/-}	56
Figura 14. Camundongos CLEC7A ^{-/-} apresentam maior sobrevivência frente à infecção por <i>N. caninum</i>	58
Figura 15. O tratamento com laminarina aumenta a produção de IL-12p40 durante a fase aguda da infecção por <i>N. caninum</i>	60
Figura 16. O tratamento com Laminarina aumenta a produção de ROS em células do lavado peritoneal de camundongos na fase aguda da infecção por <i>N. caninum</i>	61
Figura 17. O tratamento com laminarina reduz o parasitismo <i>in vitro</i>	63
Figura 18. A produção de espécies reativas de oxigênio é crucial para o controle do parasitismo na infecção por <i>N. caninum</i>	64
Figura 19. <i>Neospora caninum</i> modula a produção de espécies reativas de oxigênio por meio de CLEC7A favorecendo sua proliferação.....	65
Figura 20. O tratamento com Laminarina reduz o parasitismo agudo por <i>Neospora caninum</i>	67
Figura 21. O tratamento com Laminarina reduz o parasitismo crônico e inflamação cerebral por <i>Neospora caninum</i>	58
Figura 22. O tratamento com Laminarina reduz a produção de anticorpos IgG1 durante a infecção por <i>N. caninum</i>	69
Figura 23. Camundongos tratados com Laminarina apresentam maior sobrevivência frente à infecção por <i>N. caninum</i>	71

Figura 24.A associação de Laminarina com antígeno lisado de <i>N. caninum</i> (NLA) em protocolo de imunização não influencia na produção de anticorpos da classe IgG.....	73
Figura 25.A associação entre Laminarina e antígenos lisados de <i>N. caninum</i> (NLA) em protocolo de imunização aumenta a capacidade de reconhecimento antigênico por anticorpos da classe IgG.....	74
Figura 26.A imunização com antígenos lisados de <i>N. caninum</i> (NLA) associado à Laminarina aumenta a sobrevivência de camundongos desafiados com <i>N. caninum</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos conjugados com fluorocromos utilizados em ensaios decitometriade fluxo.....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMDCs	Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea;
BMDMs	Macrófagos Derivados de Medula Óssea;
CD80/B7-1	Cluster de Diferenciação 80;
CD86/B7-2	Cluster de Diferenciação 86;
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária;
CLEC7A	Lectina do Tipo C pertencente à família 7A;
EDTA	ÁcidoEtilenodiamino Tetra-Acético;
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> ;
GM-CSF	Fator Estimulante de Crescimento de Monócitos e Granulócitos;
HD	Hospedeiro Definitivo;
HI	Hospedeiro Intermediário;
IL-10	Interleucina 10;
IL-12	Interleucina 12;
IL-1β	Interleucina 1 beta;
IL-6	Interleucina 6;
ITAM	Motivo de Ativação Baseado em Tirosina;
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos;
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> –Proporção de parasitos por células;
NADPH	Nicotinamida AdeninaDinucleotídeo Fosfato Oxidase;
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas;
NFκB	Fator Nuclear Kappa B;
NO	Óxido Nítrico;
NOX2	Subunidade da NADPH oxidase;
PBS	Tampão Fosfato Salino;
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase;
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio;
SFB	Soro Fetal Bovino;
Src	Proteína Tirosina QuinaseProto-Oncogene;
SyK	Tirosina Quinase Esplênica;
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa;
-/- ou KO	Nocautem –Deficienteem determinada molécula ;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O protozoário <i>Neospora caninum</i>	17
1.2 Hospedeiros e ciclo de vida	17
1.3 Patogênese	20
1.4 Sinais clínicos	21
1.5 Epidemiologia e prevalência	21
1.6 Profilaxia e tratamento	22
1.7 Resposta Imune	23
1.8 Receptor lectínico tipo C, CLEC7A	25
1.9 Beta glucanos	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
Objetivo geral	31
Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Animais	32
4.2 Ensaio de bloqueio de CLEC7A	32
4.3 Cultivo de taquizoítos de <i>Neospora caninum</i>	33
4.4 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)	33
4.5 Diferenciação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs)	34
4.6 Quantificação de citocinas	34
4.7 Citometria de Fluxo	35
4.7.1 Expressão de moléculas de superfície	35
4.7.2 Avaliação de parasitismo agudo	36
4.7.3 Quantificação de ROS e NO	36
4.8 Determinação do parasitismo <i>in vitro</i> por microscopia ótica	37
4.9 Avaliação da resposta imune humoral: Quantificação de IgG e subclasses anti- <i>N. caninum</i>	37
4.10 <i>Western Blot</i>	38
4.11 Determinação da inflamação tecidual <i>in vivo</i>	38
4.12 Detecção de parasitismo crônico por PCR em tempo real	39
4.13 Imunização e posterior desafio	39

4.14	Ensaio de Imunoistoquímica	39
4.15	Análise de sobrevivência	40
4.16	Análise estatística	40
5.	RESULTADOS	41
5.1	Avaliação do papel do receptor CLEC7A na infecção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por <i>N.caninum</i>	41
5.1.1	Expressão de CLEC7A em diferentes tipos de células do exsudato peritoneal de camundongos C57BL/6 infectados com <i>N.caninum</i>	41
5.1.2	Produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas	44
5.1.3	Expressão de moléculas co-estimulatórias e de apresentação de antígenos em macrófagos.....	48
5.1.4	Parasitismo <i>in vitro</i>	53
5.1.5	Parasitismo <i>in vivo</i>	53
5.1.6	Sobrevivência	57
5.2	CLEC7A como um alvo para o desenvolvimento de medidas terapêuticas na infecção por <i>Neospora caninum</i>	59
5.2.1	O tratamento com Laminarina induz maior produção de IL-12p40 e espécies reativas de oxigênio (ROS) na infecção aguda por <i>N. caninum</i>	59
5.2.2	O tratamento de macrófagos com Laminarina reduz o parasitismo	62
5.2.3	CLEC7A modula a produção de ROS, uma molécula importante no controle da infecção por <i>N. caninum</i>	62
5.2.4	Parasitismo e Inflamação <i>in vivo</i> após tratamento com Laminarina.....	66
5.2.5	Produção de anticorpos específicos anti- <i>Neospora caninum</i> em camundongos tratados ou não com Laminarina	66
5.2.6	O tratamento com Laminarina aumenta a sobrevivência de camundongos infectados com <i>N. caninum</i>	70
5.3	CLEC7A como um alvo para o desenvolvimento de medidas profiláticas na infecção por <i>Neospora caninum</i>	72
5.3.1	Produção de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> por camundongos imunizados com NLA associado ou não a Laminarina.....	72
5.3.2	A imunização com NLA associado à Laminarina resgata animais da infecção por <i>N. caninum</i>	72
6.	DISCUSSÃO	76
7.	CONCLUSÕES	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

Uma das principais causas de aborto em bovinos se deve à infecção por *Neospora caninum*. Diversos receptores de reconhecimento de padrão têm sido estudados na resposta imune frente a infecção por este protozoário o qual apresenta ampla glicosilação proteica em sua superfície. Desse modo, objetivou-se avaliar o papel do receptor imune inato do tipo C-lectínico CLEC7A, um ligante de glicanos, durante a infecção por *N. caninum*. Observou-se, por meio de infecções experimentais em camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e geneticamente deficientes de CLEC7A (CLEC7A^{-/-}), que a ausência do receptor induz maior sobrevivência, menor carga parasitária aguda e crônica, além de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias. Notou-se também menor parasitismo em Macrófagos Derivados de Medula Óssea (BMDMs) infectados por *N. caninum*. Adicionalmente, constatou-se que tanto BMDMs quanto Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea (BMDCs) CLEC7A^{-/-} apresentaram maior produção de IL-1β, IL-6, IL-12p40, TNFα e IL-10. Visto a função imunomoduladora de CLEC7A, utilizou-se um bloqueador deste receptor (Laminarina) em protocolos de imunização e tratamento contra a infecção pelo protozoário em questão. Certificou-se que a administração de Laminarina induz maior produção de IL-12p40 e ROS por células peritoneais, reduz o parasitismo agudo e crônico e conseqüentemente a inflamação cerebral crônica em camundongos WT. Além disso, o tratamento com Laminarina reduziu a produção de IgG1 e aumentou o reconhecimento antigênico pelos anticorpos. Durante a administração de Laminarina em ensaios *in vitro*, observou-se menor parasitismo em BMDMs tratados com o bloqueador e ausência de atividade citotóxica pelo mesmo. Os resultados demonstram que CLEC7A está envolvido na resposta imune frente à infecção por *N. caninum* e que este receptor é utilizado pelo parasito para modular a resposta imune. Assim bloqueadores de CLEC7A, como Laminarina podem ser aplicados em protocolos profiláticos e terapêuticos contra a infecção pelo parasito.

Palavras chave: CLEC7A, *N. caninum*, Laminarina, Neosporose

ABSTRACT

A major cause of abortion in cattle is due to infection with *Neospora caninum*. Several pattern recognition receptors have been studied in the immune response against infection by this protozoan which has extensive surface protein glycosylation. Thus, this work aimed to evaluate the role of the innate immune receptor C-type lectin (CLEC7A), a binder of glycans, during *N. caninum* infection. It was observed through of experimental infections in wild type (WT) and CLEC7A deficient (CLEC7A^{-/-}) C57BL/6 mice, that the absence of this receptor induces increased survival, lower acute and chronic parasitism, and increase of the proinflammatory cytokines production. It was also noted lower parasitism in Bone Marrow Derived Macrophages (BMDMs) infected with *N. caninum*. Additionally, it was found that both BMDMs as Dendritic Cells Derived from Bone Marrow (BMDCs) CLEC7A^{-/-} showed increased production of IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF α and IL-10. Due to CLEC7A immunomodulatory function, it's used Laminarin to block this receptor in protocol of the immunization and treating against protozoan infection in question. It was observed that Laminarin administration induces the higher ROS and IL-12p40 production by peritoneal cells, reduces the acute and chronic parasitism and therefore chronic cerebral inflammation. In addition, Laminarin-treatment reduced IgG1 production and increased antigen-recognition by antibodies. During Laminarin administration *in vitro* assays, it was observed lower parasitism in BMDMs treated with the blocker and the absence of cytotoxic activity of this. The results demonstrate that CLEC7A is involved in the immune response to *N. caninum* infection and this parasite use the receptor to modulate the immune response. Therefore CLEC7A blockers like Laminarin can be applied to prophylactic and therapeutic protocols against infection by the parasite.

Keywords: CLEC7A, *N. caninum*, Laminarin, Neosporosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 O protozoário *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, Família *Sarcocystiidae* e subfamília *Toxoplasmatinae*, composta por parasitos pertencentes aos gêneros *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Isospora*, *Sarcocystis*, *Frenkelia* e *Hammondia* (DUBEY et al., 1988, 2011). As primeiras evidências sobre a existência deste parasito foram descritas por Bjerkas et al. em 1984, na Noruega, em cães sorologicamente negativos para *T. gondii* e que apresentavam distúrbios neurológicos como paralisia dos membros posteriores. Em 1988, Dubey e colaboradores descreveram *N. caninum* como uma nova espécie e gênero, ao estudarem cortes histológicos de cães com doença fatal sugestiva de toxoplasmose. Eles observaram que algumas características histopatológicas e estruturais como tamanho de cisto formado no sistema nervoso central, e a própria sintomatologia clínica o diferenciava do quadro de toxoplasmose até então conhecido (DUBEY & LINDSAY, 1993). A partir de então, este parasito passou a ser cada vez mais estudado, sendo na década de 90 relacionado também a casos de abortos em bovinos (CONRAD et al., 1993)

Atualmente, este parasito é reconhecido mundialmente como uma importante causa de aborto infeccioso em bovinos (DUBEY et al., 2011), o que gera grandes perdas econômicas para cadeia produtiva de leite e carne no país (REICHEL et al., 2013), uma vez que a transmissão vertical deste parasito ocorre com grande eficiência, sendo estimada entre 70-100% nas gestações em que as fêmeas são previamente positivas (PARÉ, et al., 1996, ANDERSON, et al., 1997, SCHARES, et al., 1998, BJÖRKMAN, et al., 2003, HALL, et al., 2005).

1.2 Hospedeiros e ciclo de vida

A via de transmissão horizontal ocorre quando se tem a ingestão de cistos teciduais presentes na musculatura dos hospedeiros intermediários, e pela ingestão de oocistos liberados nas fezes dos hospedeiros definitivos. Contudo, a via de maior eficiência de transmissão é a vertical, demonstrada em várias espécies (bovinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos, murinos, suínos e primatas não-humanos), com alta eficiência, onde a fêmea transmite a infecção ao feto via placenta, contribuindo de forma significativa para a persistência da infecção na população. (COLE et al., 1995; DUBEY & LINDSAY, 1993; MOSKWA et al.,

2007). Outras rotas secundárias de transmissão já foram investigadas, contudo mostram-se improváveis de contribuir de modo significativo com a situação epidemiológica da infecção (UGGLA et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 2003; MOSKWA et al., 2007).

Os hospedeiros definitivos deste protozoário são os membros da família dos canídeos, sendo oocistos isolados das fezes de cães (*Canis lupus familiaris*), coiotes (*Canis latrans*), dingos australianos, cachorros-do-mato e lobos-cinzentos, enquanto uma vasta gama de animais já foram identificados como hospedeiros intermediários, tais como: gatos (*Felis silvestres catus*), suínos (*Sus domesticus*), caprinos (*Capra aegagrus*), equinos (*Equus ferus*), bovinos (*Bos taurus*), bubalinos (*Syncerus caffer*), raposas (*Vulpes vulpes*), coiotes (*Canis latrans*), lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), alpacas (*Vicugna pacos*), veados (*Cervus elaphus*), camelos (*Camelus sp*) (DUBEY; SCHARES & ORTEGA-MORA, 2007), psitacídeos (MINEO et al., 2011), dentre outros.

N. caninum possui ciclo de vida heteroxeno (Figura 1), realizando replicação sexuada e assexuada em hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente. A replicação assexuada pode ocorrer em todos os animais homeotermos, enquanto a reprodução sexuada ocorre somente nos canídeos (GONDIM et al., 2004), que também podem se comportar como hospedeiros intermediários do parasito. Este protozoário apresenta três formas evolutivas descritas: taquizoítos, os quais encontram-se circulantes ou agrupados nos chamados vacúolos parasitóforos, encontrados no citoplasma das células infectadas. Apresentam replicação rápida por endodiogenia e capacidade de infectar diferentes tipos celulares como: neurônios, fibroblastos, células do endotélio vascular, células musculares, hepatócitos e principalmente células com potencial macrofágico (BARR et al., 1994; DUBEY et al., 2003). Os bradizoítos, são formas de latência do parasito, replicam-se lentamente durante a fase crônica da infecção e formam cistos teciduais, principalmente em tecidos musculares e do sistema nervoso central. Os cistos teciduais são estruturas capazes de impedir a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que apresentam camada externa composta principalmente por antígenos do próprio hospedeiro. Os esporozoítos encontram-se contidos em oocistos e são resultantes da replicação sexuada do agente no trato gastrointestinal dos hospedeiros definitivos. Após replicação sexuada em células do trato digestivo dos hospedeiros definitivos, os oocistos são liberados ainda na forma imatura nas fezes e, posteriormente, em condições apropriadas de temperatura e umidade, esporulam-se e tornam-se infectantes (DUBEY; SCHARES & ORTEGA-MORA, 2007).

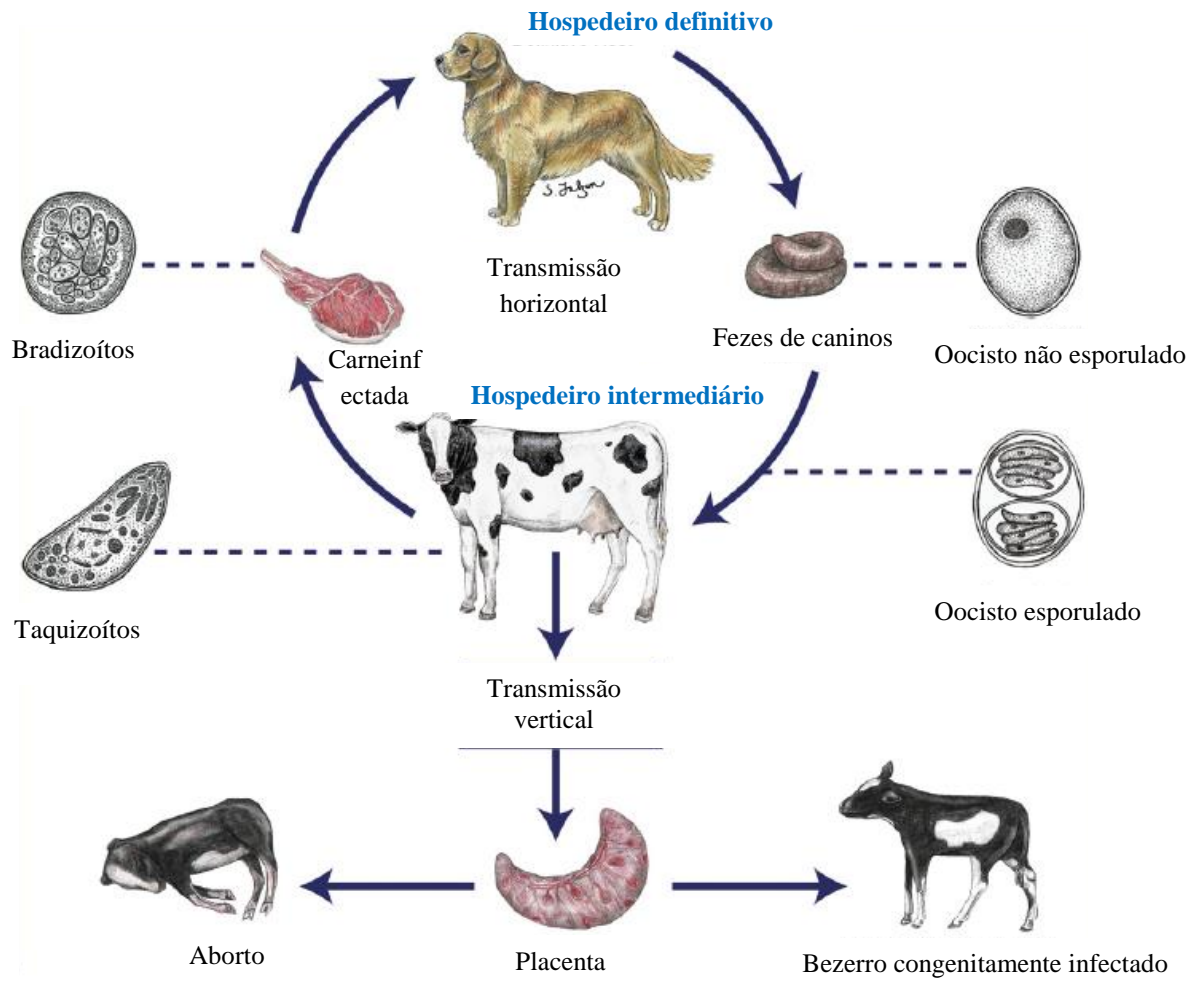


Figura 1 -Ciclo Biológico de *Neospora caninum*.(Adaptado de Goodswen, 2013).

1.3 Patogênese

A invasão celular é o principal evento na patogênese da infecção por *N. caninum* e envolve processos complexos e muito semelhantes entre os parasitos do filo Apicomplexa, por apresentarem o complexo apical composto por micronemas, roptrias e grânulos densos, que são usados pelo parasito durante a adesão e invasão de células hospedeiras (BUXTON; McALLISTER & DUBEY, 2002). A invasão celular, dessa forma, é um mecanismo ativo que requer energia do parasito e pode ser resumida em três etapas:

Primeiramente ocorre a adesão do parasito à célula hospedeira. Este evento ocorre sem qualquer orientação do parasito, envolvendo proteínas de superfície como as proteínas das famílias SAG (*GPI-anchored surface antigens*: Antígenos de superfície ancorados por GPI) e SRS (*SAG1-related sequences*: Sequências relacionadas a SAG1). Na infecção por *T. gondii*, as proteínas SAG e SRS tem sido alvo de pesquisas nos últimos 30 anos, sendo recentemente relacionadas a mecanismos de virulência do parasito (WASMUTH et al., 2012; MACÊDO-JUNIOR, et al., 2013). Após a adesão inicial, os parasitos reorientam-se, posicionando a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas de micronemas (MIC) são secretadas e funcionam como adesinas, sendo responsáveis pela espessa zona de adesão e junção de forma irreversível. Após a formação desta junção, inicia-se o movimento da junção ao redor do taquizoíto, que juntamente com o citoesqueleto do parasito, força-o para dentro do VP, culminando com a invasão. A membrana plasmática da célula hospedeira é também usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos.

A segunda etapa é caracterizada pela secreção de proteínas de roptrias (ROP), que são liberadas dentro do VP e se estendem a MVP para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao VP. Na última etapa, proteínas de grânulos densos (GRA) modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento e sobrevivência do parasito. Os taquizoítos dentro do VP proliferam por endodiogenia, produzindo novos parasitos em poucos dias após a infecção e, subsequentemente, há lise da célula hospedeira e liberação dos taquizoítos que ficam livres para infectar uma variedade de tecidos e tipos celulares (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006).

1.4 Sinais clínicos

Dentre as diferentes espécies acometidas pela neosporose, o estabelecimento de protocolos de tratamento e profilaxia levam em consideração os bovinos como principal hospedeiro intermediário, e os cães como hospedeiros definitivos. Ambas as espécies apresentam na maioria das vezes uma infecção subclínica e persistente que pode sofrer reativação durante a gestação, resultando em parasitemia na fêmea e conseqüentemente transmissão vertical para o feto (BUXTON; McALLISTER & DUBEY, 2002).

A neosporose canina clínica pode ser localizada em determinado órgão, ou generalizada, com o envolvimento múltiplos órgãos como: tecido epitelial, fígado, musculatura estriada esquelética, entre outros (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002). Os quadros mais graves ocorrem em cães jovens (idade inferior a um ano) que geralmente adquirem a infecção pela via transplacentária. Estes animais geralmente apresentam um quadro inicial de paresia, principalmente de membros posteriores, que pode progredir para quadros de paralisia com hiperextensão do membro acometido. A sintomatologia neural pode variar de acordo com a localização do parasito no sistema nervoso central, sendo observado com frequência a fraqueza muscular (DUBEY et al., 2007), mialgia, hemiparesia, alterações de comportamento, cegueira, convulsões e dificuldade de deglutição (BASSO et al., 2005).

Bovinos quando adquirem a infecção na idade adulta geralmente não apresentam manifestações clínicas. As fêmeas apresentam sinais clínicos da infecção apenas na fase reprodutiva, sendo estes representados pelo aborto, tanto em gado de aptidão leiteira, como de corte. O aborto pode ocorrer em qualquer fase da gestação. Contudo, existe uma maior incidência de aborto por *N. caninum* período compreendido entre o 3º e 6º mês de gestação.

Além do aborto, vários outros eventos podem ser observados, como a morte de animais recém-nascidos, reabsorção e mumificação fetal, natimortos, recém-nascidos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados (DUBEY, 2003).

1.5 Epidemiologia e prevalência

A neosporose tem emergido como uma séria doença em bovinos e cães em todo o mundo (DUBEY, 2003) e a infecção em bovinos por *N. caninum* já foi relatada em todos os continentes (DUBEY; SCHARES & OTEGA-MORA, 2007; SPILOVSKÁ et al., 2009; YU et

al., 2009; PANADERO et al., 2010). Abortos e mortalidade neonatal associados à neosporose também foram descritos em diversos países da América do Sul, como Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai, mostrando que 12 a 42% de fetos abortados de bovinos de leite estavam infectados por *N. caninum* (MOORE, 2005). Na região do Triângulo Mineiro, a soroprevalência de neosporose em rebanhos bovinos com problemas reprodutivos foi estimada em 17% (MINEO et. al., 2006). As variações observadas na prevalência da neosporose bovina dependem do país analisado, bem como do manejo da aptidão zootécnica dos rebanhos. Dentre os fatores de risco, pode-se listar: número de gestações, presença e número de cães na fazenda, idade do gado, entre outros.(GOODSWEN; KENNEDY & ELLIS 2013).

Infecções subclínicas por *N. caninum* em cães também têm grande importância epidemiológica por serem os hospedeiros definitivos e poderem eliminar oocistos nas fezes, contribuindo para a contaminação ambiental. Estudos mostram que existe uma maior soroprevalência em cães de área rural (20% a 97%) que de área urbana (7% a 26%), sugerindo que cães que vivem em ambientes rurais sofrem maior exposição ao parasito. Tais fatos ressaltam a importante associação epidemiológica entre bovinos e cães, já que eles podem ter contato com placentas e fetos abortados de bovinos (PATITUCCI et al., 2001; ANTONY & WILLIAMSON, 2003; FERNANDES et al., 2004; LASRI et al., 2004).

1.6 Profilaxia e tratamento

A neosporose bovina é comumente negligenciada pelos profissionais da área e proprietários rurais. Em contrapartida, alguns profissionais preconizam métodos radicais de controle da infecção, como eliminação de todo o rebanho (GOODSWEN; KENNEDY & ELLIS, 2013). O controle correto desta infecção é baseado na prevenção da contaminação do ambiente com oocistos liberados por hospedeiros definitivos, restringindo o acesso destes animais nas proximidades do rebanho, o descarte dos animais infectados e o uso de sistema de transferência de embriões para prevenção da transmissão vertical do parasito para novas gerações (WILLIAMS & TREES, 2006).

A vacinação parece ser o meio mais viável economicamente para controlar a neosporose, já que o sacrifício de animais ou seus possíveis tratamentos demandariam maiores despesas para os criadores dos rebanhos (REICHEL & ELLIS, 2009). No entanto, até o presente momento, não existe uma vacina comercial com proteção satisfatória (porcentagem

significativa de animais protegidos após imunização), que seja capaz de induzir uma imunidade protetora contra o parasito em bovinos. Uma vacina chegou a estar disponível comercialmente (BovilisNeoGuard®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, EUA), consistindo de taquizoítos inativados, contudo apresentou baixa eficácia em ensaios de campo e foi descontinuada (REICHEL & ELLIS, 2009; WESTEN, HEUER & WILLIAMSON, 2012). Em Costa Rica, esta vacina foi testada a campo e observaram uma eficácia inferior a 45%, conforme indicado pelo fabricante (ROMERO et al., 2004). Neste sentido, há uma concordância entre diferentes grupos de pesquisa de que ainda restam desafios a serem transpostos para que haja o desenvolvimento de uma vacina eficiente a campo e que seja capaz de ganhar a aceitação de mercado (REICHEL & ELLIS, 2009; ROJO-MONTEJO, et al., 2013).

Em casos de infecção já estabelecida, o diagnóstico clínico e laboratorial da parasitose deve ser realizado e o tratamento implantado. Atualmente, as bases farmacológicas utilizadas em modelos experimentais para o tratamento das infecções por *N. caninum* são coccidiostáticos como o toltrazuril. Contudo, outros estudos com as mesmas bases sugerem que estes compostos apresentam efeitos desejáveis apenas em taquizoítos, não existindo evidências de seu efeito em bradizoítos (REICHEL & ELLIS, 2009; WILLIAMS & TREES, 2006; DEBACHE et al., 2011). Outro grupo de quimioterápicos utilizados são as sulfas, como a sulfadiazina, que em estudos com camundongos tem mostrado eficiência de 90% no combate a *N. caninum* (DUBEY & LINDSAY, 1996).

1.7 Resposta Imune

A imunidade inata tem papel essencial na proteção contra as infecções causadas por protozoários. Os protozoários induzem uma resposta baseada na produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ), produzidas por células *natural killer* (NK), as quais são dependentes da produção de interleucinas pró-inflamatórias como IL-12 e, em menor grau, de fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-18 por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (ALIBERTI et al., 1996; GAZZINELLI et al., 1994; SCOTT, 2003). Além de conferir resistência durante os estágios iniciais da infecção, a ativação dos componentes celulares da imunidade inata é essencial para a diferenciação de linfócitos Th1 e o estabelecimento da imunidade mediada por células, os quais são responsáveis pela resistência à infecção crônica,

bem como a reinfecção pelo mesmo parasito (BIRON; GAZZINELLI, 1995; MULLER et al., 2001).

Durante os estágios iniciais da infecção, os protozoários desencadeiam uma série de eventos que levam macrófagos, células dendríticas e neutrófilos a sintetizar citocinas pró-inflamatórias e expressar moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86 (REIS e SOUZA et al., 1999). Essa cascata de eventos leva por sua vez a uma forte ativação de células pertencentes à imunidade inata e adquirida. Esta ativação inicial do compartimento celular inato é essencial para a indução da síntese de IFN- γ por células NK. IFN- γ é uma citocina chave na ativação de macrófagos, com o intuito de se eliminar parasitos através de vários mecanismos efetores, como a produção de reativos intermediários de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio (ROS) (SPOONER et al., 2011). Adicionalmente, a produção precoce de IL-12 é crítica para direcionar a diferenciação de precursoras de células T auxiliares no fenótipo Th1 (ZHU et al., 2010). Os linfócitos Th1 diferenciados serão a base de uma imunidade efetora que controlará a replicação dos protozoários durante os estágios crônicos da infecção, principalmente com a produção de altos níveis de IFN- γ (ALMERÍA et al., 2012). Outra propriedade dos linfócitos Th1 é o auxílio no desenvolvimento e ativação de linfócitos T CD8+, os quais estão envolvidos no controle da replicação dos parasitos por meio da produção adicional de IFN- γ , além de apresentar atividade citotóxica (TANAKA et al., 2000). Adicionalmente, os linfócitos Th1 participam da indução de secreção de anticorpos específicos por linfócitos B, os quais promovem a eliminação dos parasitos por meio de lise mediada por complemento, favorecendo assim a opsonização por macrófagos (GAZZINELLI et al., 2004).

Especificamente na infecção por *N. caninum*, a participação efetiva das diferentes classes de imunoglobulinas ainda é pouco entendida. Especula-se que os anticorpos tenham um papel auxiliar no controle da infecção, participando da neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, podendo, assim, reduzir a disseminação do agente (INNES et al., 2002). Em concordância, foi observado que camundongos infectados com *N. caninum* apresentam expansão clonal de linfócitos B periféricos e a sua ausência leva a uma falha no controle da infecção (AMMANN et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

Quando o hospedeiro é capaz de ativar uma resposta imune celular eficiente contra *N. caninum*, este parasito passa a alternar a expressão de genes como NcSAG1 (taquizoíta-específico) e NcSAG4 (bradizoíta-específico), que desencadeiam eventos como a

interconversão de estágios, e a migração preferencial para o sistema nervoso central (HOWE et al., 1999; COLLANTES-FERNANDÉZ et al., 2006) onde o parasito permanece em estado de latência. O estado de latência pode ser quebrado por diferentes estímulos que culminam em imunossupressão (tratamento com glicocorticoides, estado de estresse, entre outros) ou indução de resposta com perfil Th2 que predomina durante quadros de hipersensibilidade, infecções por helmintos e no período gestacional das fêmeas. Em tais situações, o parasito sofre novas interconversões de estágio e volta à forma de replicação rápida (taquizoítos) causando danos extensos ao hospedeiro. Este fato é relevante em fêmeas prenhes, uma vez que respostas imunes predominantemente Th1 são incompatíveis com o sucesso de uma gestação (RAGHUPATHY, 1997). Para que o feto e seus anexos possam ser reconhecidos como ‘próprios’ durante o período gestacional, há uma imunomodulação da resposta levando à expressão de citocinas para um padrão Th2 nos linfócitos T CD4+, sendo este perfil induzido principalmente pelos altos níveis de progesterona mantidos durante a gestação. Esta imunomodulação é realizada por IL-10, que possui efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- γ , pela diferenciação de clones Th1, produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T CD4+ e CD8+, além da produção de IL-12 por células acessórias (INNES et al., 2002).

1.8 Receptor lectínico tipo C, CLEC7A

Para que haja a ativação dos diferentes compartimentos do sistema imune, as células imunológicas devem reconhecer patógenos por meio de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Dentre estes, podemos destacar a família dos receptores do tipo Toll (TLRs), que foram descritos como importantes na resistência a infecção por *N. caninum* (MINEO et al., 2009; MINEO et al., 2010). Dentre as demais classes de receptores inatos, existem aqueles pertencentes a grande família de Lectinas do tipo-C, que apresentam capacidade descrita de reconhecer glicanos.

CLEC7A, também conhecido como Dectina-1 (GOODRIDGE et al., 2011), foi o primeiro receptor de reconhecimento padrão não pertencente à família dos TLRs estudado. Análises estruturais de CLEC7A a classificam como uma proteína transmembrana do tipo II, composta por um domínio lectínico tipo-C (C-terminal) na superfície externa da membrana plasmática, uma região “stalk”, um único domínio transmembrana, e uma cauda intracitoplasmática de 40 aminoácidos (ARIIZUMI et al., 2000). Esse receptor é expresso

principalmente por células de origem mielóide, incluindo macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. CLEC7A também foi identificado com sendo expresso em linfócitos B e T, contudo é aparentemente afunção em células da imunidade adaptativa (WILLMENT et al., 2005).

A ativação da sinalização intracelular por este receptor assemelha-se a sinalização induzida por receptores de células T (TCRs), células B (BCRs) e receptores de Fc (FcR), que induzem a ativação de proteínas baseadas em resíduos de tirosina (ITAMs). Entretanto CLEC7A, diferentemente dos demais receptores baseados em tirosina, apresenta apenas uma única sequência YXXL denominada de “hemITAM”, o que faz com este receptor necessite da formação de dímeros para induzir a ativação da cascata intracelular. A formação destes dímeros de receptor é facilitada pela flexibilidade dos constituintes da membrana plasmática. Após interação receptor-ligante (β -glucanos), se tem a formação de um dímero de CLEC7A que fornece duas regiões com tirosina capaz de ativar a proteína Src (que apresenta dois sítios de ligação com tirosina) e conseqüentemente ativa Syk, dando sequência a cascata de sinalização via CLEC7A (GRINGHUSIS et al., 2009) (Figura 2).

Estudos recentes tem mostrado a habilidade de CLEC7A em ativar diferentes vias de sinalização intracelular. Atualmente, existem basicamente duas vias bem caracterizadas: As vias dependentes e independentes de Syk. A primeira pode levar à ativação canônica de NF- κ B por ativar as subunidades p65 e c-Rel, bem como a ativação da via não-canônica com envolvimento da subunidade RelB (GRINGHUSIS et al., 2009; GEIJTENBEEK et al., 2009). Alguns trabalhos ainda citam o envolvimento das proteínas que contem o domínio de recrutamento de Caspase - como CARD9 - nesta via de sinalização, contudo a participação destas proteínas nesta via de reconhecimento ainda é controversa (BI et al., 2010). CLEC7A também pode induzir a ativação de Proteínas Kinases ativadas por Mitógenos (MAPKs), como a p38, e fatores de transcrição como NFAT (GOODRIDGE et al., 2007; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007). Quanto as vias de sinalização independentes de Syk, aquela com melhor descrição ocorre através da ativação de Raf-1. No entanto, assemelha-se a via dependente de Syk no ponto de ativação de NF- κ B. Esta via Syk independente apresenta papel importante no contexto das respostas a diferentes patógenos, uma vez que ela está relacionada com “*crosstalk*” entre a sinalização de CLEC7A e TLRs (TLR2 e TLR4) (GRINGHUSIS et al., 2009).

A sinalização via CLEC7A é de extrema importância para que as células imunes desempenhem papéis na resposta imune contra patógenos, principalmente fungos tais como: *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, e também, micobactérias, agentes que possuem parede celular rica em glicanos. Após sua ativação e desencadeamento das cascatas de sinalização intracelular, diversas moléculas são expressas, dentre elas podemos destacar as citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos da inflamação, espécies reativas de oxigênio (ROS) e reativos intermediários de nitrogênio (NO), que recrutam e coordenam a ativação de outras células da imunidade (SAIJO et al., 2007; WERNER et al., 2009).

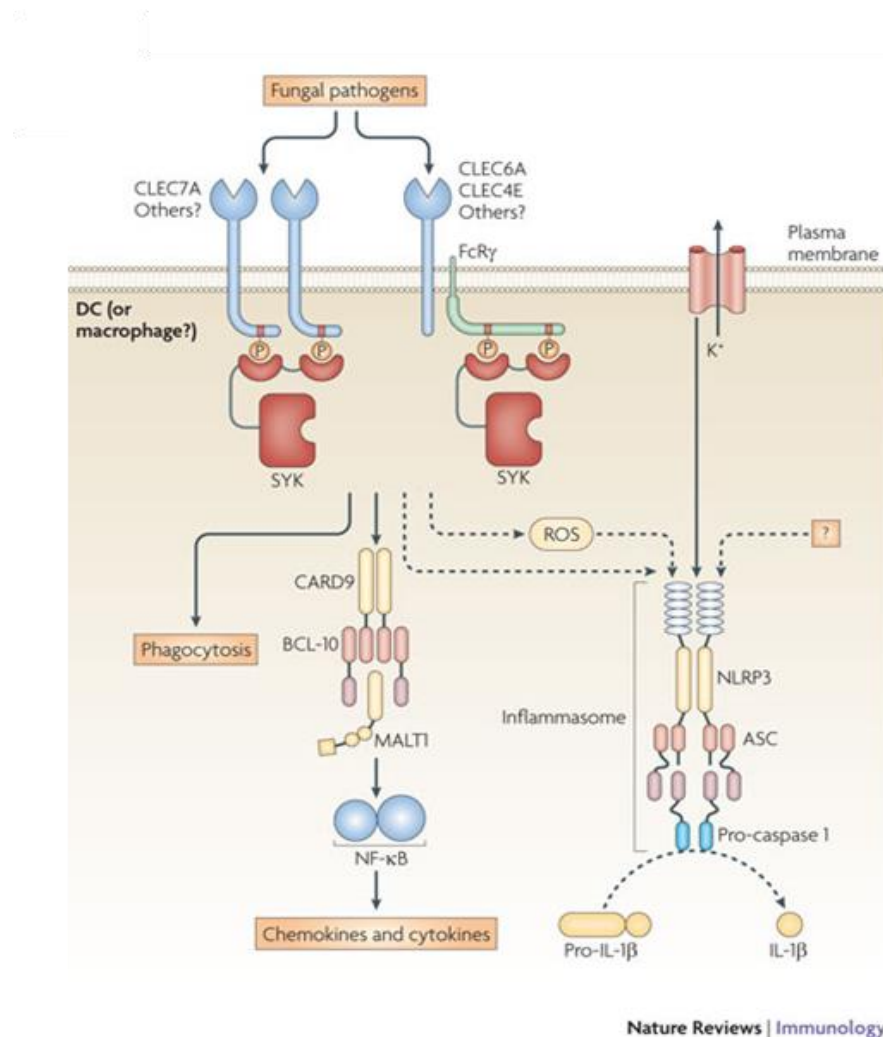


Figura 2: Sinalização via CLEC7A. Adaptado de Mócsai et al., 2010

1.9 Beta glucanos

A propriedade imunomoduladora dos glucanos tem sido reconhecida há décadas. Existem diferentes tipos de glucanos, porém a atividade imunomoduladora melhor conhecida é dos glucanos que possuem ligações do tipo β , usualmente extraídos de leveduras como *Sacharomyces cerevisiae*, cogumelos como *Sclerotium glaucanicum*, e bactérias como *Alcaligenes faecalis* (GOODRIDGE et al., 2009). Além destes organismos, existem outras fontes de glucanos como os polissacarídeos botânicos que tem apresentado um grande número de propriedades terapêuticas, embora os mecanismos envolvidos neste efeito ainda sejam pouco entendidos (SCHEPETKIN et al., 2006).

Da mesma forma que β -glucanos constituintes de patógenos possuem a capacidade de ativar a resposta imune, estes glucanos também podem ser extraídos, purificados e têm sido utilizados como agonistas ou antagonistas de determinadas vias de sinalização buscando potencializar respostas imunes em diferentes protocolos vacinais ou de tratamento. Isto foi visto por Muramatsu e colaboradores (2012), onde a administração por via oral do β -1,3/1,6-D-glucano extraído de *Aureobasidium pullulans* protege camundongos desafiados com a cepa PR8-H1N1 do vírus da influenza. Outro estudo apresenta que a associação entre um β -glucano extraído de soja (*Glycine max*) quando associado a antígenos de *N. caninum* em protocolos de imunização de camundongos apresenta resultados promissores no controle da infecção por *N. caninum* (MANSILLA et al., 2011).

A capacidade imunomodulatória dos β -glucanos seja quando presente em microrganismos patogênicos ou comensais, ou quando utilizadas em protocolos terapêuticos ou profiláticos depende de vários fatores, dentre eles a própria estrutura do glucano: qualidade de glicídios (Manose, Glicose); quantidade de glicídios; tipo de ligação química entre as moléculas dos mesmos, entre outros (GOODRIDGE et al., 2011).

Neste trabalho foi utilizado Laminarina, um pequeno β -glucano (6-8 kDa) de reserva encontrado na alga marrom *Laminaria digitata* para avaliar o papel de CLEC7A na infecção por *N. caninum*. Este glucano é formado por moléculas de glicose ligadas por ligações do tipo beta entre os carbonos 1 e 3, e 1 e 6 de cada molécula (RIOUX et al., 2010). Atualmente inúmeras atividades biológicas têm sido atribuídas à Laminarina como: antitumoral, imunomoduladora, antibacteriana, antiviral, regulação de lipídeos no sangue, e antioxidante (GAO et al., 2011; MENG et al., 2012). Laminarina é um glucano solúvel que apresenta a capacidade de ligar-se a CLEC7A. No entanto, não induz ativação de vias de sinalização

ativadas por CLEC7A. Por isso, há décadas este pequeno β -glucano vem sendo utilizado com um bloqueador da via de sinalização CLEC7A (CZOP et al., 1985) nos mais diversos estudos.

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, o setor agropecuário é responsável por 27% do Produto Interno Bruto (PIB) direto, 42,5% das exportações totais em 2009 e mais de 17 milhões de empregos. Além disso, o país é o principal fornecedor de 25% do mercado mundial de alimentos (GOVERNO FEDERAL DO BRASIL, 2009). Detém o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, e o maior rebanho comercial com mais de 200 milhões de cabeças (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013). É o maior exportador de carnes, faturando no ano de 2013, 1.153,289 reais (IBGE, 2013). Dentro deste contexto, a bovinocultura vem sendo o expoente dentre as diversas áreas da pecuária. Neste sentido, doenças infecciosas que afetam principalmente o sistema reprodutivo dos animais são peculiarmente danosas, uma vez que podem condenar matrizes e quebrar o ciclo de expansão da indústria que depende de produtos cárneos e lácteos.

Neospora caninum é um protozoário potente causador de abortos em bovinos e que pode também estar relacionado ao ganho de peso incipiente em novilhas e bezerros sorologicamente positivos, resultando na perda média de 7,5 kg na idade de abate, e gerando uma diminuição da eficiência na conversão alimentar (BARLING et al., 2000). Estudos recentes estimam que as perdas econômicas globais causadas pela neosporose podem exceder dois bilhões de dólares nos EUA (REICHEL et al., 2013).

De forma geral os mecanismos inatos relacionados com a resistência contra *N. caninum* ainda são desconhecidos. No presente momento, sabe-se do envolvimento dos TLRs no reconhecimento do parasito (MINEO et al., 2009) como sendo crucial para a resistência dos hospedeiros frente à infecção aguda pelo protozoário. Adicionalmente, estes receptores inatos são responsáveis pela indução de um perfil de resposta do tipo Th1 e apresentaram grande potencial de adjuvância em ensaios imunoproliféricos para *N. caninum* (RIBEIRO et al., 2009; MINEO et al., 2010). O papel das demais classes de receptores inatos ainda não foi determinado para a infecção por *N. caninum* e não há a descrição na literatura vigente de reconhecimento de protozoários por receptores da família de receptores lectínicos do tipo-C (CLRs) como CLEC7A.

Uma vez conhecido o padrão molecular capaz de se ligar em CLEC7A (1,3 e 1,6 β -glucano) (GOODRIDGE et al., 2009), e que *N. caninum* apresenta sua superfície rica em glicosilações (BASZLER et al., 1996). A avaliação do papel desse receptor se torna indispensável para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas contra a infecção por *N. caninum*.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Caracterizar a participação do receptor imune inato CLEC7A na infecção por *N. caninum*.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 3.1. Avaliar, através da técnica de citometria de fluxo, a expressão do receptor CLEC7A nos diferentes tipos celulares durante a infecção *in vivo* por *N. caninum*;
- 3.2. Determinar em ensaios *in vitro* e *in vivo* a relação de CLEC7A com a produção de diferentes moléculas do sistema imune inato e adaptativo, tais como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e imunoglobulinas;
- 3.3. Avaliar em macrófagos de medula óssea de camundongos selvagens e geneticamente deficientes em CLEC7A a expressão de moléculas coestimuladoras e de apresentação antigênica (CD80, CD86, MHCI e MHCII) importantes no mecanismo de apresentação de antígenos;
- 3.4. Avaliar, através da quantificação da carga parasitária, determinação de inflamação tecidual e análise de sobrevivência, o papel de CLEC7A na resistência do hospedeiro frente à infecção por *N. caninum*;
- 3.5. Avaliar o potencial de utilização de inibidor competitivo específico de CLEC7A em protocolos de imunização e terapêuticos contra a infecção por *N. caninum*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram obtidos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes em CLEC7A (CLEC7A^{-/-}) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Gordon Brown (Universidade de Aberdeen, Escócia, Reino Unido). Camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes em NOX2 (GP91Phox^{-/-}) foram gentilmente cedidos pela Profa. Leda Quércia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Todos os animais foram mantidos no CBEA em condições padronizadas de criação, sob condições padrões de ambiente com temperatura de 25°C e ciclos de 12 horas de luz, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, 1991). Os protocolos para utilização dos animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA / UFU, protocolo número 100/10– Anexo I).

4.2 Ensaio de bloqueio de CLEC7A

O glicano Laminarina foi utilizado como bloqueador de CLEC7A em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Em ensaios *in vitro* foi utilizada a dose de 1mg/mL diluído em RPMI 1640, suplementado com glutamina (2mM) e antibiótico/antimicótico (Gibco - penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 g/ml e anfotericina B 0,25 g/ml). As células foram incubadas com Laminarina por três horas antes da incubação com taquizoítos de *N. caninum*. Nos ensaios *in vivo* foi utilizada a dose de 1mg/animal diluído em 0,2 mL de PBS estéril por via intraperitoneal. Durante os ensaios *in vivo* foram adotados dois protocolos assim denominados: Tratamento e Imunização. Denominou-se tratamento quando os animais receberam sete doses de Laminarina, durante sete dias consecutivos, sendo desafiados com taquizoítos de *N. caninum* no quarto dia de tratamento, concomitante com a quarta dose de Laminarina. Já nos protocolos de imunização, os animais receberam três doses de Laminarina associada ou não a antígenos de *N. caninum* com intervalo de vinte e um dias entre as doses. Estes animais foram então desafiados quinze dias após a última imunização.

4.3 Cultivo de taquizoítos de *Neospora caninum*

Monocamadas de células HeLa foram mantidas em garrafas de 75cm² a 37°C com 5% CO₂ em meio RPMI 1640 com 2mM glutamina (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), antibiótico/antimicótico (Gibco - penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 g/ml e anfotericina B 0,25 g/ml). Os taquizoítos de *N. caninum* foram mantidos em monocamadas de células HeLa a 37°C com 5% CO₂, com meio RPMI 1640, adicionado de glutamina (2mM) e antibiótico/antimicótico. Após lise da monocamada de HeLa, as garrafas foram lavadas e o sobrenadante, contendo taquizoítos de *N. caninum*, foi transferido para tubo cônico e centrifugado (800 x g, por 10 minutos, 4°C). O pellet, formado por parasitos, foi ressuspensionado e a contagem destes foi realizada em câmara de Neubauer.

4.4 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Após a eutanásia, os camundongos foram pulverizados com álcool 70% e os fêmures e tíbias foram obtidos e dissecados. Em uma câmara de fluxo laminar, os ossos foram colocados em álcool 70% por 1 minuto e as epífises foram cortadas. Os ossos foram lavados com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI 1640 incompleto e uma agulha de 26G de diâmetro. A suspensão celular obtida foi centrifugada (400 x g, 10 minutos, 4°C) e ressuspensionada em meio R20/30, composto por meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina e 30% de sobrenadante de células L929 (LCCM; MARIM, et al., 2010). A suspensão celular foi distribuída igualmente em placas de Petri e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após noventa e seis horas de incubação, foi adicionado igual volume do mesmo meio condicionado R20/30, e as placas foram mantidas na estufa a 37°C e 5% CO₂ por mais setenta e duas horas. O sobrenadante das placas de Petri foi descartado e PBS estéril a 4°C foi adicionado em cada placa. As placas foram incubadas sobre camada de gelo por 10 minutos e os macrófagos foram então removidos através de pressão por pipetagem. Por fim, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, a 4°C, e o pellet obtido foi ressuspensionado em RPMI 1640, as células contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de cultura, conforme o experimento a ser realizado.

4.5 Diferenciação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs)

Procedimento igual ao utilizado para obtenção de células de medula óssea para diferenciação em BMDMs foi realizado para diferenciação em BMDCs. Após obtenção das células do lavado medular, as mesmas foram distribuídas em placas de Petri contendo meio de diferenciação: RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina e 25 ng/mL de citocina recombinante murina GM-CSF (Peprotech, EUA) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por setenta e duas horas. Após este período, foi adicionado igual volume do meio de diferenciação contendo 50 ng/mL de citocina recombinante GM-CSF (Peprotech) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por mais setenta e duas horas. Posteriormente, foi realizado a coleta do sobrenadante contendo as células não aderentes, que foram contadas e plaqueadas em placas apropriadas para cada ensaio.

4.6 Quantificação de citocinas

BMDMs e BMDC obtidos de camundongos WT e CLEC7A^{-/-} foram cultivados em placas de 96 poços (1x10⁶ células/ml) em quadruplicata em meio RPMI incompleto, e incubados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* por mais 24 horas. Após este período o sobrenadante coletado e armazenado a -70°C para posterior análise quantificação da produção de citocinas por ELISA. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes.

Camundongos WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose não letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum* e após três dias de infecção foram eutanasiados para coleta de órgãos e realização do lavado peritoneal. Os órgãos foram utilizados para determinação de parasitismo por PCR e em homogenatos de tecidos para quantificação de citocinas. O lavado peritoneal foi utilizado para determinação do parasitismo agudo por citometria de fluxo nas células obtidas no pellet após centrifugação, e o sobrenadante foi armazenado a -70°C para posterior quantificação de citocinas por ELISA.

Para quantificação de citocinas foram utilizados: sobrenadante de cultura celular, homogenato de tecido e exsudato peritoneal de camundongos. As seguintes citocinas: IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 e TNFα foram quantificadas pela técnica ELISA tipo sandwich, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes (BD Biosciences, San Diego, EUA). Resumidamente, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning/Costar, EUA) foram

sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura e incubadas overnight à 4°C. Após lavagem das placas com PBS adicionado de Tween 0,05% (PBS-T) e bloqueio com PBS contendo 10% soro fetal bovino, as amostras foram adicionadas. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplo seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados e conjugados com estreptavidina-peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Seguiu-se com o último ciclo de lavagem, e as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H₂O₂ a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* SoftMax Pro (Molecular Devices).

4.7 Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada em diferentes ensaios: Fenotipagem de BMDMs e BMDCs diferenciadas *in vitro*, ensaios de parasitismo celular, ensaios de expressão de CLEC7A e moléculas CD80, CD86, MHCI e MHCII, e para detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO. Para cada tipo de ensaio foi seguido um protocolo previamente padronizado.

4.7.1 Expressão de moléculas de superfície

Foram utilizados protocolos com anticorpos conjugados a fluorocromos (Tabela 1) para ensaios de fenotipagem e expressão de moléculas. Nestes ensaios, as células foram previamente lavadas e ressuspendidas em solução de bloqueio (PBS contendo 5% de soro normal de coelho) e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, anticorpos específicos a cada molécula foram diluídos (1:100) e adicionados aos tubos contendo as células em solução de bloqueio, incubados a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Seguido a este passo foram realizadas três lavagens seguidas de centrifugações (450xg/10minutos/4°C) com PBS. O sobrenadante foi desprezado eo pellet em ressuspendido em Formaldeído 4% para análise por citometria de fluxo (BD FACSCantoII, BD Biosciences, EUA). Os dados foram processados e analisados utilizando *software* apropriado (FlowJo, TreeStar, EUA) (MINEO, et al., 2009).

Tabela 1: Anticorpos conjugados com fluorocromos utilizados em ensaios de citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo
Anti-CD11b	APC-Cy7
Anti-CD11c	V450
Anti-MHCI	FITC
Anti-MHCII	PE
Anti-CD80	APC
Anti-CD86	PE.Cy7
Anti-CLEC7A	PE
Anti-CD19	APC-Cy7
Anti-CD3	Pacific Blue
Anti-CD49b	APC

4.7.2 Avaliação de parasitismo agudo

Para utilização em ensaios de citometria de fluxo os taquizoítos de *N. caninum* foram contados e ajustados a 3×10^7 taquizoítos/mL. Posteriormente, foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz com os ésteres CellTrace™ FarRed DDAO-SE (Invitrogen) ou CellTrace™CFSE (Invitrogen) na concentração de 5 μ M. Completou-se o tubo com RPMI 1640 com 2mM glutamina (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), antibiótico/antimicótico (Gibco - penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 g/ml e anfotericina B 0,25 g/ml). Centrifugou-se a 700 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em meio RPMI 1640, os taquizoítos foram contados novamente e utilizados nos respectivos ensaios.

4.7.3 Quantificação de ROS e NO

Após coleta e centrifugação do lavado peritoneal de camundongos tratados ou não com Laminarina e infectados por três dias com taquizoítos viáveis de *N. caninum*, as células foram incubadas a 37°C por 30 minutos com as sondas de ROS e NO, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2DA), respectivamente. Após este período, as células foram lavadas cinco vezes com PBS, o sobrenadante foi

desprezado e o pellet ressuspensionado em formaldeído 4% para análise por citometria de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences, EUA).

4.8 Determinação do parasitismo *in vitro* por microscopia ótica

BMDMs de camundongos WT foram plaqueados na quantidade de 1×10^5 células sob lamínulas circulares dispostas em placas de poliestireno de 24 poços. Posteriormente, as células foram tratadas ou não com Laminarina (1mg/mL) durante três horas. Em seguida, foram incubadas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* por mais 24 horas. Após este período, as células foram fixadas com formaldeído 4%, coradas com Azul de Toluidina 0,1% e coladas em lâminas para contagem em microscópio óptico por dois observadores. O parasitismo foi obtido através da média entre as leituras de dois observadores.

4.9 Avaliação da resposta imune humoral: Quantificação de IgG e subclasses anti-*N. caninum*

O método ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* em amostras de soros individuais de camundongos imunizados, segundo o protocolo anteriormente descrito (RIBEIRO et al., 2009). Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, New York, EUA) foram sensibilizadas (50 µL/poço) com antígeno NLA (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C.

Após três lavagens com PBS-T, as placas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Novas lavagens foram feitas e as placas foram incubadas com amostras de soros (50 µL/poço) diluídas 1:25 em PBS-TM a 5% para IgG total e PBS-TM a 1% para IgG1 e IgG2a, por 1 hora (IgG) ou 2 horas (IgG1 e IgG2a) a 37°C. Soros controles positivos de camundongos experimentalmente infectados com *N. caninum* e soros controles negativos (soros de camundongos não imunes) também foram incluídos. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas (50µL/poço) com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma ChemicalCo.) na diluição 1:1000 em PBS-TM a 5% ou com os anticorpos secundários biotinilados (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA) anti-IgG1 de camundongo diluído 1:4000 em PBS-TM a 1% ou anti-IgG2a de camundongo diluído 1:2000 em PBS-TM a 1%.

Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas e incubadas (50 µL/poço) com estreptavidina-peroxidase (Sigma ChemicalCo.) diluída 1:1000 em PBS-TM a 1%, quando apropriado (para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a). A reação foi revelada com 0,01 M 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonicacid (ABTS) (BD Biosciences, San Diego, EUA), e a densidade óptica foi determinada a 405 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA).

4.10 Western Blot

Membranas de nitrocelulose contendo antígenos transferidos por eletroforese foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para reação. As tiras foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente e subsequentemente incubadas por 18 horas a 4° com amostras de soros de camundongos imunizados com NLA associado ou não a Laminarina na diluição de 1:100 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado (PBS-TM). Posteriormente, as tiras foram lavadas seis vezes de 5 minutos com PBS-T, e incubadas com os conjugados enzimáticos anti-IgG de camundongo-peroxidase (diluição de 1:500). Após incubação por duas horas à temperatura ambiente e novo ciclo de lavagens como anteriormente descrito, as tiras foram reveladas pela adição do substrato enzimático 3,3'- tetrahidrocloro de diaminobenzidina em tabletes comerciais (Sigma Fast DAB, Sigma Chemical Co.). A reação foi interrompida com água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas.

4.11 Determinação da inflamação tecidual *in vivo*

Após trinta dias de infecção, camundongos tratados ou não com Laminarina foram eutanasiados e amostras de sistema nervoso central foram colhidos em formol 10% tamponado com fosfato e submetidos a procedimentos padrão de inclusão em parafina, corte e coloração com hematoxilina e eosina (CARDOSO, et al., 2011; RIBEIRO, et al., 2009) para avaliação do dano tecidual através de microscopia ótica. Escores inflamatórios foram atribuídos a cada corte histológico através de unidades arbitrárias: 0-2 leve, 2-4 moderado, 4-6 severo e acima de 6 muito severo (BENEVIDES et al., 2013). Secções de tecido cerebral de animais não infectados foram usados como controle negativo.

4.12 Detecção de parasitismo crônico por PCR em tempo real

DNA de *N. caninum* no cérebro de camundongos desafiados foi quantificado por PCR em tempo real, através do sistema de detecção SYBR green, como anteriormente descrito (WAHAB et al., 2010; CARDOSO et al., 2011). Foram utilizados os seguintes pares de primers: Forward: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; Reverse: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3' (Prodimol Biotecnologia S.A., Belo Horizonte, MG), para detecção da região Nc5 de *N. caninum*. A extração de DNA foi realizada a partir de 20 mg de tecido cerebral utilizando o kit de purificação de DNA genômico (Wizard®, PromegaCo., Madison, EUA), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm) e ajustada para 200 ng/μL com água estéril e livre de DNase. Os ensaios para quantificar a carga parasitária cerebral foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (Step One Plus, Applied Biosystems, EUA) e a contagem de parasitos foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraídos de 10⁷ taquizoítos do isolado Nc-1, que foram incluídas em cada análise.

4.13 Imunização e posterior desafio

Quatro grupos de 10 camundongos foram imunizados intraperitonealmente três vezes com intervalo de 21 dias entre as doses com volume de 200 μL/animal de acordo com as seguintes formulações: PBS, Laminarina (LAM), Antígeno lizado de *Neospora caninum* (NLA) e Laminarina associada à NLA (NLA + LAM). Amostras de sangue foram coletadas dos diferentes grupos nos dias 0, 21, 42 e 59 pós-imunização para análise da presença de anticorpos específicos no soro. Duas semanas após a última imunização os camundongos foram desafiados via intraperitoneal com dose letal de *N. caninum* e monitorados diariamente por 30 dias para análise de sobrevivência.

4.14 Ensaios de Imunoistoquímica

A marcação fluorescente do parasito foi realizada em lâminas contendo secções de tecido cerebral. A titulação de anticorpos e demais reagentes foram previamente padronizadas por MINEO et al., (2009) com modificações. As laminas foram marcadas com anticorpo policlonal contra *N. caninum* (10 μg/ml) obtido de gema de ovo de galinhas imunizadas com

antígeno lisado de *N. caninum* (FERREIRA-JUNIOR, et al., 2012). Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anti-IgY conjugado com Fitic (Sigma-Aldrich) como anticorpo secundário de acordo com as instruções do fabricante (1:300). 4',6-Diamidino-2-Fenil Indol, Diidroclorido - DAPI (2 µg/ml) foi utilizado para marcação de núcleos (Life Technologies). As lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 9.0) e analisadas em microscópio de fluorescência (FSX100, Olympus, Japão). As amostras foram consideradas positivas quando marcação brilhante foi observada nos tecidos analisados, indicando agregados de parasitos. Controles não infectados foram submetidos em paralelo para assegurar a especificidade do teste.

4.15 Análise de sobrevivência

Camundongos WT e *CLEC7A*^{-/-}, ou camundongos selvagens tratados ou não com Laminarina foram infectados com dose letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum* e monitorados diariamente durante trinta dias em relação à sobrevivência e peso corporal. Após este período os animais sobreviventes foram eutanasiados seguindo as normas estabelecidas pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas de Eutanásia em Animais (CFMV, 2013).

4.16. Análise estatística

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Dados foram expressos em média e desvio padrão e analisados pelo teste *One-way* ou *Two-way* ANOVA, conjuntamente com o *post-test* de comparação múltipla de Bonferroni para comparar pares selecionados de grupos. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significantes para um nível de $p < 0,05$. Dados obtidos de citometria de fluxo foram analisados e os gráficos/figuras foram construídos utilizando o *software* (FlowJo, TreeStar, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do papel do receptor CLEC7A na infecção *in vitro* e *in vivo* por *N.caninum*

5.1.1 Expressão de CLEC7A em diferentes tipos de células do exsudato peritoneal de camundongos C57BL/6 infectados com *N.caninum*

Buscando avaliar a expressão do receptor CLEC7A durante a fase aguda da infecção por *N. caninum*, camundongos WT foram infectados com dose não letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum* e a expressão de CLEC7A na superfície dos diferentes tipos celulares foi avaliada por citometria de fluxo. Foi observado que os diferentes tipos celulares apresentam expressão diferenciada deste receptor. Dentre os diferentes tipos celulares analisados no exsudato peritoneal, a expressão de CLEC7A apresentou-se alterada após a infecção por *N. caninum* apenas em macrófagos, células dendríticas e células polimorfonucleares. O único fenótipo celular que demonstrou aumento na expressão de CLEC7A mediante o desafio infeccioso foram as células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺, em *gate* de monócitos), em que praticamente toda a população passou a apresentar altos níveis de CLEC7A (Figura 3A). Já em macrófagos (CD11b⁺CD11c⁻, em *gate* de monócitos; Figura 3B), de forma geral, houve uma redução na expressão deste receptor, que apresentava-se com baixa expressão homogênea nesta população anteriormente ao desafio infeccioso. Mediante a infecção experimental, apenas uma pequena parcela das células aumentaram a expressão de CLEC7A, enquanto as demais células tornaram-se negativas. Ainda em relação às células de origem mielóides, foi observado que a população de neutrófilos elicitados durante a infecção (CD11b⁺, em *gate* de células polimorfonucleares) apresentou drástica redução na expressão de CLEC7A (Figura 3C). As linhagens linfocíticas, compostas por células *Natural Killer* (CD3⁻CD49b⁺, Figura 3D), linfócitos T (CD3⁺CD19⁻; Figura 3E) e B (CD3⁻CD19⁺; Figura 3F), não apresentaram expressão de CLEC7A em camundongos *naïve* e infectados experimentalmente com *N. caninum*.

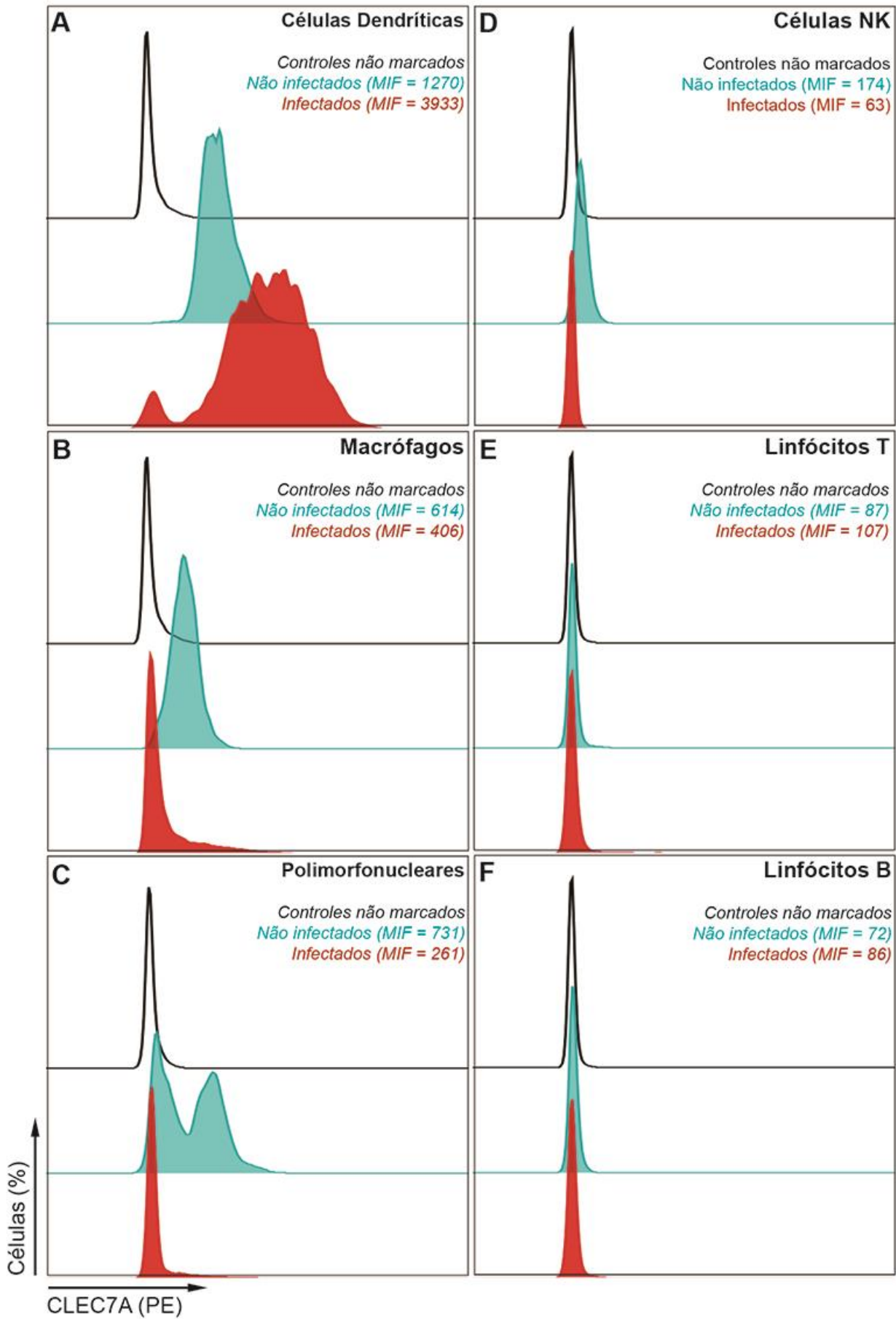


Figura 3: Caracterização da expressão de CLEC7A em células do exsudato peritoneal de camundongos. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com dose não letal de *N. caninum* e a expressão de CLEC7A avaliada após três dias de infecção por citometria de fluxo. (A – E) são histogramas representativos de cada linhagem de células analisada. Em (A) observa-se uma maior expressão de CLEC7A em células dendríticas (CD11c+, CD11b+) durante a infecção; (B) representa uma redução na expressão de CLEC7A em macrófagos (CD11b+), contudo uma pequena parte destes macrófagos apresentam maior expressão do receptor, demonstrando uma heterogeneidade na expressão do mesmo em macrófagos; (C) representa uma maior expressão de CLEC7A em células “*Natural Killer*” (CD49b+). Nos demais tipos celulares: (D) Polimorfonucleares, (E) Linfócitos T e (F) Linfócitos B não se têm diferenças na expressão de CLEC7A durante a infecção por *N. caninum*.

5.1.2 Produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas

Uma vez observado que macrófagos e células dendríticas apresentam alterações expressivas na expressão de CLEC7A durante a infecção aguda por *N. caninum*, estas células foram adotadas como modelo experimental para análise *in vitro* das diferentes moléculas envolvidas na resposta imune inata contra este protozoário.

Com intuito de avaliar a relação de CLEC7A com a produção de citocinas *in vitro*, macrófagos(BMDM) e células dendríticas (BMDC) foram diferenciados de medula óssea de camundongos WT e CLEC7A^{-/-} e incubadas ou não com taquizoítos viáveis de *N. caninum* por 24 horas. A produção de citocinas foi quantificada pelo método de ELISA no sobrenadante de cultura celular. Ao contrário do observado em relação à expressão de CLEC7A em células peritoneais durante a infecção por *N. caninum*, onde células dendríticas apresentam maior expressão do receptor, a produção diferencial das citocinas analisadas mediante a infecção por *N. caninum* em animais WT e CLEC7A^{-/-} mostrou-se semelhante nos dois tipos celulares(BMDM - Figura 4; BMDC - Figura 5).

Quando avaliado a influência de CLEC7A na produção de citocinas, foi observado que este receptor apresenta um papel imunomodulador durante a infecção por *N. caninum*, uma vez que células obtidas de camundongos CLEC7A^{-/-} apresentam maior produção de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF- α e IL-10.

Com a intenção de se confirmar os resultados obtidos *in vitro*, camundongos WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose não letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum* e a produção de IL-12p40 foi detectada pelo método de ELISA no fluido do lavado peritoneal e em homogenato de baço realizados após três dias de infecção. Os resultados apresentam que a concentração de IL-12p40 é significativamente maior tanto no lavado peritoneal (Figura 6A) quanto no homogenato de baço (Figura 6B) de animais CLEC7A^{-/-}.

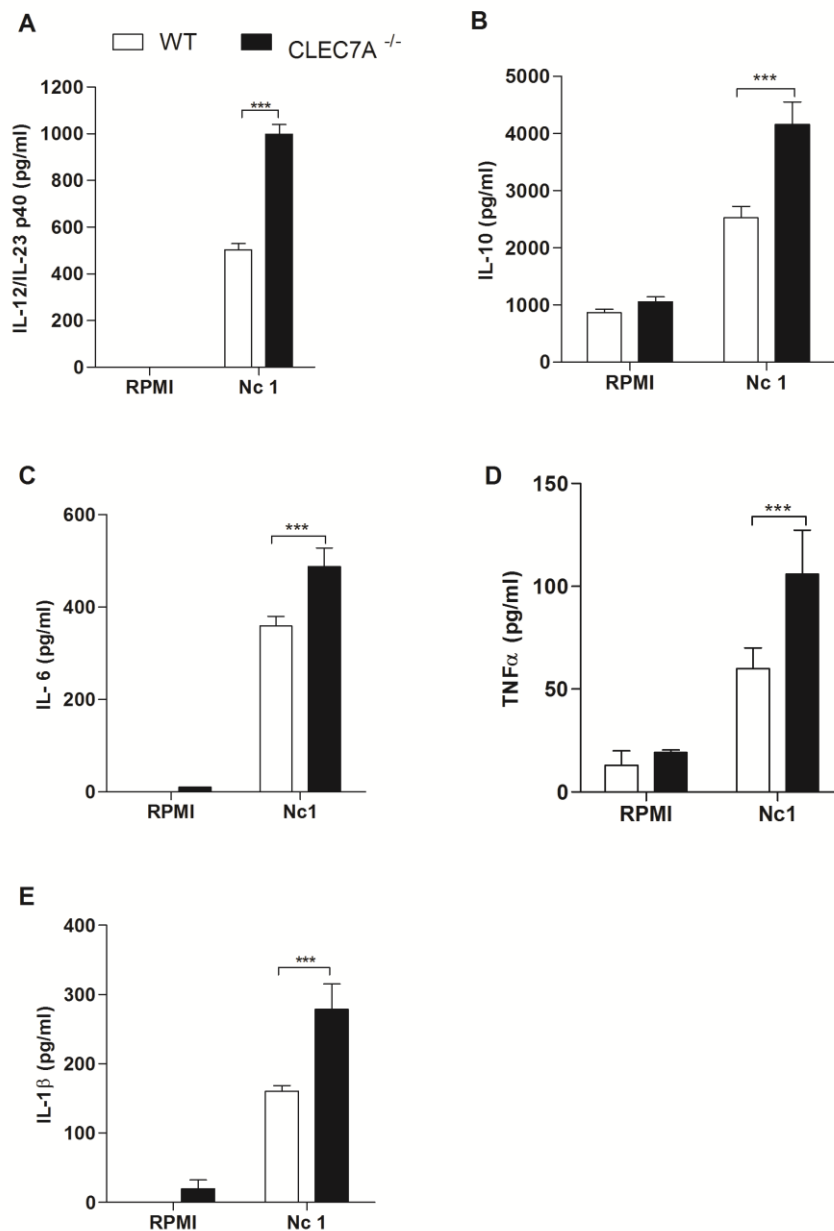


Figura 4: Macrófagos CLEC7A^{-/-} apresentam maior produção de diferentes citocinas quando incubados com taquizoítos de *N. caninum*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens e CLEC7A^{-/-} foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI: 1) e a produção de citocinas avaliada por ELISA. Observa-se que macrófagos CLEC7A^{-/-} apresenta produção de (A) IL-12p40, (B) IL-10, (C) IL-6, (D) TNF α , (E) IL-1 β . Os resultados foram apresentados em média \pm SD. *** indica relevância estatística em que $p < 0.001$.

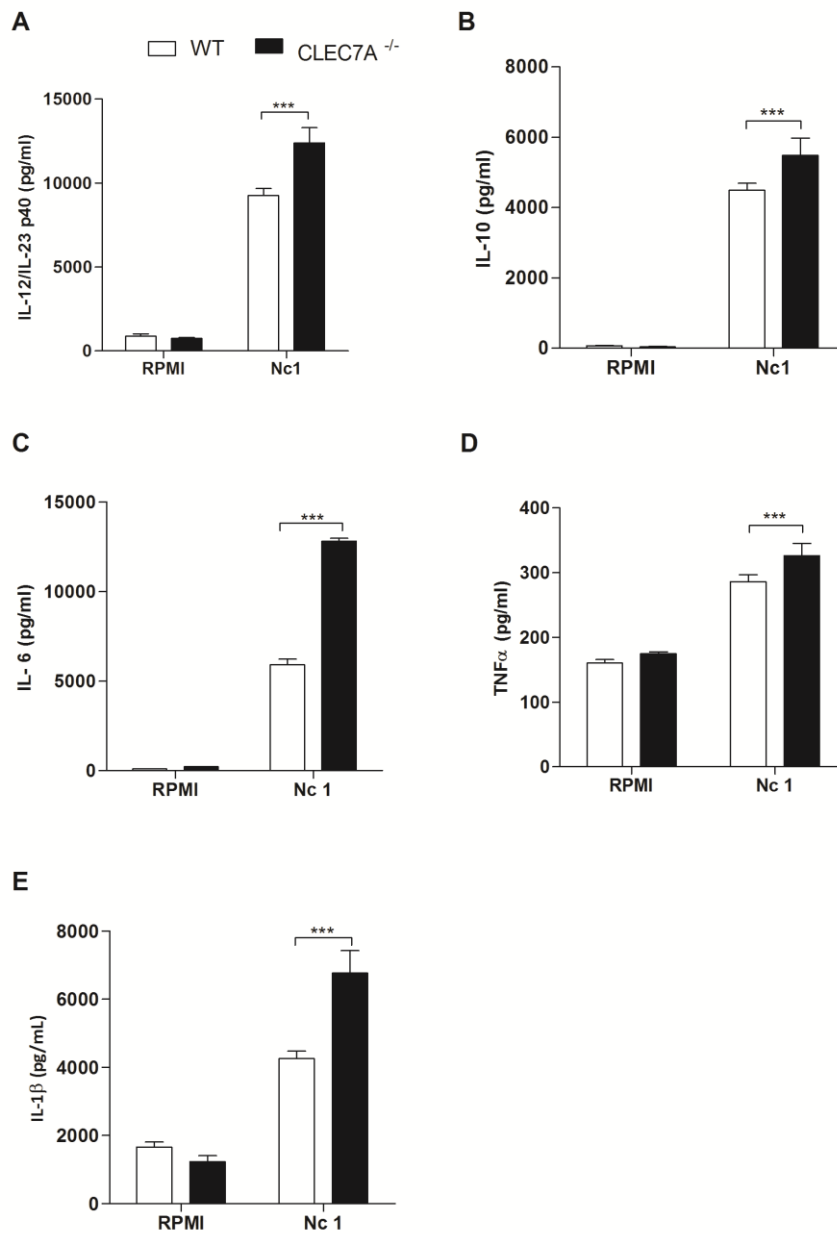


Figura 5: Células Dendríticas CLEC7A^{-/-} apresentam maior produção de diferentes citocinas quando incubados com taquizoítos de *N. caninum*. Células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) de camundongos C57BL/6 selvagens e CLEC7A^{-/-} foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI: 1) e a produção de citocinas avaliada por ELISA. Observa-se que BMDC CLEC7A^{-/-} apresenta produção de (A) IL-12p40, (B) IL-10, (C) IL-6, (D) TNF α , (E) IL-1 β . Os resultados foram apresentados em média \pm SD. *** indica relevância estatística em que $p < 0.001$.

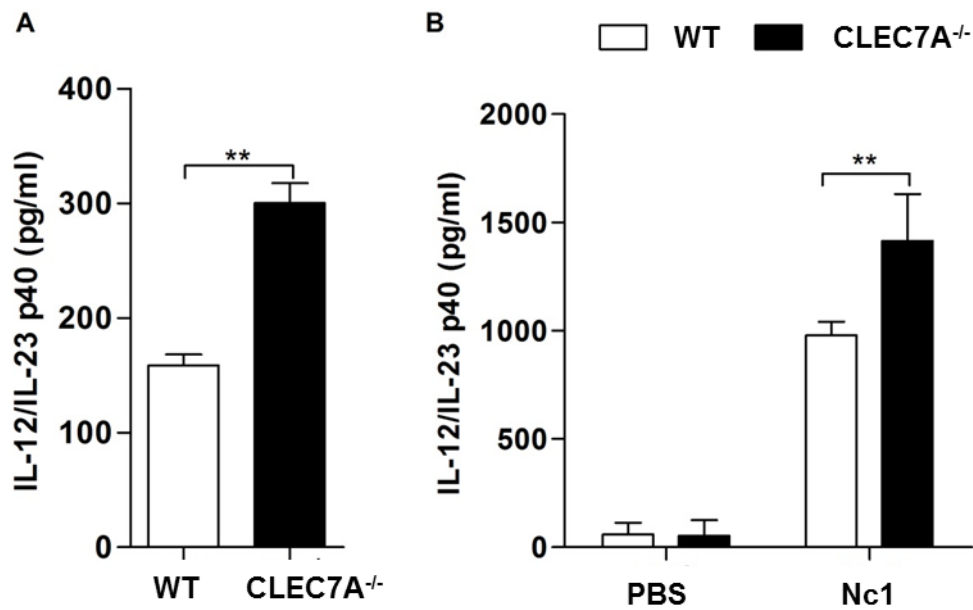


Figura 6: Produção de IL-12p40 durante a fase aguda da infecção por *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose não letal de taquizoítos de *N. caninum*. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal (A) e a retirada do baço (B) para detecção de IL12p40 por ELISA. Observou-se que tanto no lavado peritoneal quanto no homogenato de baço existe uma maior concentração de IL-12p40 em animais CLEC7A^{-/-}. Os resultados foram apresentados em média \pm SD. ** indica relevância estatística em que $p < 0.01$.

5.1.3 Expressão de moléculas co-estimulatóriase de apresentação de antígenos em macrófagos

Durante o processo de apresentação de antígenos, crucial para a indução de uma resposta imune adaptativa adequada para o controle da infecção, as moléculas co-estimuladoras são peças-chave nesta importante sinapse imunológica. Assim, a expressão de CD80 e CD86 foi observada em BMDMs WT e CLEC7A^{-/-} após 24 horas de incubação com taquizoítos de *N. caninum*. Observou-se que constitutivamente BMDMs CLEC7A^{-/-} expressam menor quantidade de CD80, demonstrando uma correlação entre a expressão deste receptor e a presença de CD80 (Figura7). Observou-se também que BMDMs WT, quando infectados por *N. caninum*, apresentam uma redução pouco significativa da expressão de CD80, podendo ser um mecanismo de modulação da resposta imune pelo protozoário. No entanto, macrófagos CLEC7A^{-/-} quando incubados com taquizoítos de *N. caninum* apresentam um aumento bastante expressivo da molécula CD80 em sua superfície, sugerindo uma maior habilidade destes BMDMs na ativação da resposta imune. Quando se avalia a expressão de CD86, observa-se que constitutivamente não se tem diferenças expressivas na expressão desta molécula nos diferentes tipos celulares aqui estudados. Após incubação destas células com taquizoítos de *N. caninum*, a expressão de CD86 torna-se aumentada em BMDMs de ambas as origens (WT e CLEC7A^{-/-}), mostrando que CLEC7A não está diretamente relacionado com a expressão desta molécula co-estimulatória (Figura 8).

Objetivando avaliar a influência de CLEC7A na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHCI e MHCII), BMDMs WT e CLEC7A^{-/-} foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* e a expressão destas moléculas avaliadas por citometria de fluxo. Foi observado que em células não infectadas a expressão MHCII é semelhante em BMDMs WT e CLEC7A^{-/-}. Após a incubação com *N. caninum*, observa-se que ambos os tipos de BMDMs apresentam um aumento na expressão de MHCII. No entanto, macrófagos CLEC7A^{-/-} apresentam um aumento um pouco mais expressivo desta molécula apresentadora de antígenos (Figura 9). Quanto à expressão de MHCI em BMDMs WT e CLEC7A^{-/-}, foi observado que em células não infectadas a expressão é semelhante em ambos os tipos celulares. Entretanto, a incubação com taquizoítos de *N. caninum* induz uma maior expressão de MHCI tanto em BMDMs WT quanto em CLEC7A^{-/-}. Contudo, BMDMs WT apresentam um aumento ligeiramente superior de MHCI do que BMDMs CLEC7A^{-/-} (Figura10).