

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GALECTINA-3 EM CAMUNDONGOS  
EXPERIMENTALMENTE INFETADOS COM *Neospora caninum***

Fernando William Moreira Santana

Uberlândia – MG  
Novembro – 2022

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GALECTINA-3 EM CAMUNDONGOS  
EXPERIMENTALMENTE INFETADOS COM *Neospora caninum***

Fernando William Moreira Santana  
Discente

Tiago Wilson Patriarca Mineo  
Orientador

Dissertação apresentada ao colegiado  
do Programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre.

Uberlândia – MG  
Novembro – 2022

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

---

S232a Santana, Fernando William Moreira, 1997-  
2022 Avaliação do papel de galectina-3 em camundongos experimentalmente infetados com *neospora caninum* [recurso eletrônico] / Fernando William Moreira Santana. - 2022.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5377>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

---

Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925  
Bibliotecário Documentalista



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado nº 284				
Data:	21/11/2022	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:00
Matrícula do Discente:	12022IPA001				
Nome do Discente:	Fernando William Moreira Santana				
Título do Trabalho:	Análise do papel de Galectina-3 em camundongos experimentalmente infetados com <i>Neospora caninum</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de Patógenos Causadores de Doenças Infecciosas e Parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos mecanismos de reconhecimento imunes frente a infecção pelos protozoários <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>				

Reuniu-se no dia 21 de novembro, às 14:00 horas, por vídeo conferência, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Tiago Wilson Patriarca Mineo (Presidente) orientador do candidato, Silas Silva Santana - UFVJM; Flávia Batista Ferreira França - UFU; Suplente: Bruna Barbosa de Sousa Simamoto - UFU.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Tiago Wilson Patriarca Mineo, apresentou a Comissão Examinadora, e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

#### APROVADO.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Batista Ferreira França, Usuário Externo**, em 21/11/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silas Silva Santana, Usuário Externo**, em 21/11/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4079305** e o código CRC **D2A73395**.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formas evolutivas de <i>Neospora caninum</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Ciclo do <i>Neospora caninum</i> .....	9
<b>Figura 3.</b> Visão geral do risco potencial ou fatores de proteção que influenciam a transmissão horizontal ou vertical de <i>Neospora caninum</i> e a ocorrência de abortos exógenos ou endógenos associados a <i>N. caninum</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Reconhecimento pelas galectinas.....	14
<b>Figura 5.</b> Expressão, secreção e diversidade funcional das galectinas.....	15
<b>Figura 6.</b> Galectina-3 está relacionada com a variação de peso corporal na infecção por <i>N. caninum</i> .....	24
<b>Figura 7.</b> Galectina-3 não influencia na replicação parasitária <i>in vivo</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Galectina-3 não controla a inflamação tecidual durante a infecção por <i>N. caninum</i> .....	26
<b>Figura 9.</b> A ação de galectina-3 não interfere na produção de IgG anti- <i>N.caninum</i> .....	27

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 <i>Neospora caninum</i> .....	7
1.2 Patogênese e patologia.....	9
1.3 Epidemiologia.....	10
1.4 Resposta imune celular .....	12
1.5 Resposta imune humoral.....	16
1.6 Modelos animais de infecção .....	16
2. JUSTIFICATIVA .....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivos gerais.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
4.1 Animais.....	20
4.2 Parasitos .....	20
4.3 Parâmetros de morbidade.....	21
4.4 Desenho experimental .....	21
4.5 Quantificação de parasitos.....	21
4.6 Análises histológicas .....	22
4.7 Preparação de antígeno solúvel de <i>N. caninum</i> .....	22
4.8 ELISA indireto para IgG anti- <i>N. caninum</i> .....	23
4.9 Análises estatísticas.....	23
5. RESULTADOS .....	24
7. CONCLUSÃO .....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
9. ANEXO .....	38

## RESUMO

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo *Apicomplexa*, causador da neosporose, uma doença de importância médica veterinária por causar doenças neuromusculares em cães e abortos em bovinos, gerando perdas afetivas e econômicas para tutores e para as empresas do ramo da pecuária, respectivamente. Por tais motivos, uma série de estudos tem sido realizados para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção e tratamento da infecção, incluindo pesquisas relacionadas a imunidade inata contra esse parasito. Dentre os receptores da imunidade inata, as galectinas, proteínas lectinas com afinidade a  $\beta$ -galactosídeos, reconhecem moléculas presentes em parasitos, estimulando a resposta imune do hospedeiro. Nesse contexto, esse trabalho visa determinar o papel de Galectina-3 em camundongos durante a infecção por *N. caninum*. Desta forma, foram analisados morbidade e mortalidade em camundongos selvagens (WT) e camundongos geneticamente deficientes em Galectina-3 (*Gal3*<sup>-/-</sup>) infectados com taquizoítos, bem como alterações histopatológicas, parasitismo tecidual e produção de anticorpos desses animais durante a infecção aguda (7 dias) e crônica (30 dias) por *N. caninum*. Foi observado que os camundongos *Gal3*<sup>-/-</sup> apresentaram uma menor perda de peso corporal ao longo do curso da infecção, quando comparado com o grupo WT. Contudo, não houve diferença no parasitismo cerebral entre os camundongos *Gal3*<sup>-/-</sup> e WT. Em sintonia, camundongos *Gal3*<sup>-/-</sup> e WT apresentaram um padrão inflamatório similar, com a presença de focos inflamatórios múltiplos no parênquima do cérebro. Avaliou-se também a influência de Galectina-3 na produção de IgG anti-*N. caninum* e foi observado que essa molécula não influencia diretamente na produção de anticorpos IgG específicos para *N. caninum*. Com base nestes dados, concluímos que não há evidências de que Galectina-3 participe do processo de resistência imunológica de camundongos durante a infecção pelo protozoário *N. caninum*.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, Galectina-3, Modelo experimental

## ABSTRACT

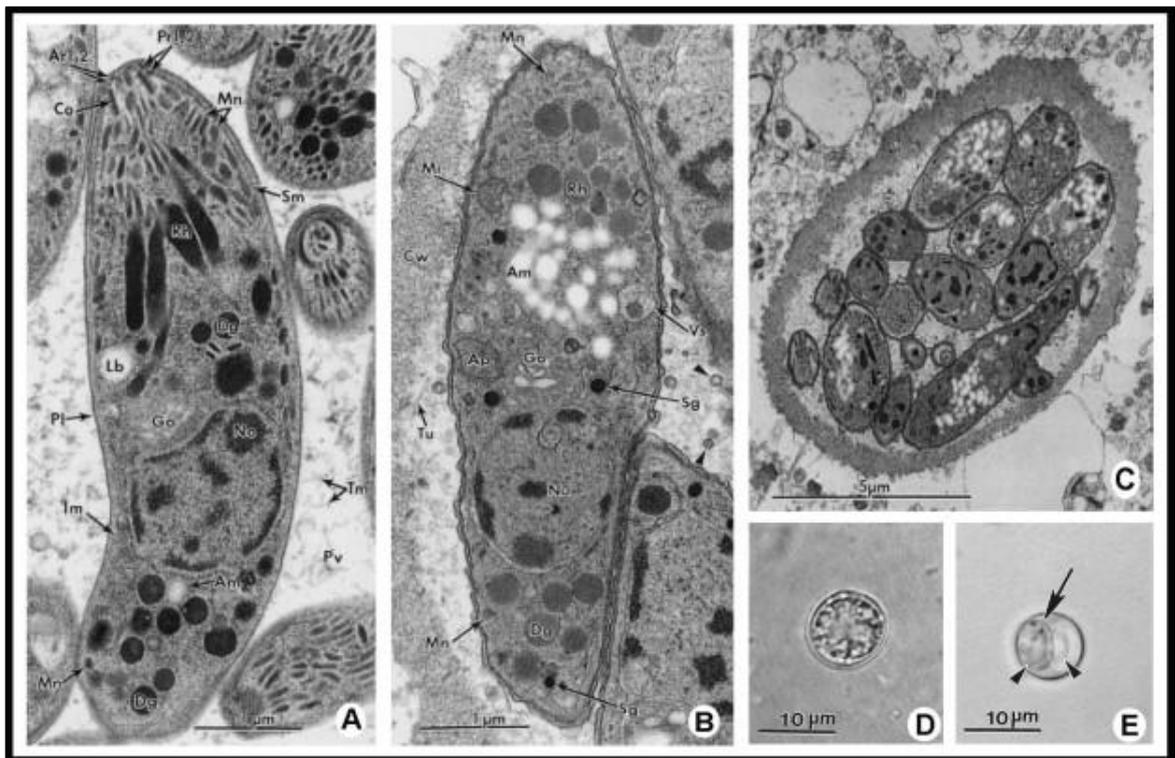
*Neospora caninum* is a mandatory intracellular protozoan that belongs to the phylum Apicomplexa and is the causative of neosporosis, a disease of great medical-veterinary importance for causing neuromuscular diseases in dogs and abortions in cattle, generating great economic losses for dog owners and livestock companies, respectively. For these reasons, several studies have been made in the development of strategies for the prevention and treatment of this infection, including research related to innate immunity against this parasite. Among the receptors of innate immunity, the galectins, lectins proteins with affinity to  $\beta$ -galactosides, recognize molecules present in parasites, stimulating the host's immune response. In this context, our work aimed to determine the role of the galectin-3 in mice resistance during *N. caninum* infection. For this, we analyzed the morbidity and mortality rates from wild type (WT) and genetically depleted for Galectin-3 (*Gal3*<sup>-/-</sup>) mice infected with tachyzoites, as well as histopathological changes, parasitism and antibody production in these animals in acute (7 days) and chronic (30 days) infection with *N. caninum*. We observed that the *Gal3*<sup>-/-</sup> mice had a less loss of body weight when compared to the WT group. However, there was no difference in cerebral parasitism between *Gal3*<sup>-/-</sup> and WT mice. In addition, *Gal3*<sup>-/-</sup> and WT mice showed similar inflammatory condition, with multiple inflammatory foci in the brain parenchyma. Moreover, we evaluated the influence of Galectin-3 in the production of IgG anti-*N. caninum* and we could notice that this molecule does not directly influence the production of IgG antibodies specific to *N. caninum*. Based on these data, we can conclude that there is no evidence that Galectin-3 participate in the immunological resistance process in mice during the infection by *N. caninum* protozoan.

Keywords: *Neospora caninum*, Galectin-3, Experimental models

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Neospora caninum*

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo *Apicomplexa*, causador da neosporose. O ciclo biológico de *N. caninum* envolve três formas evolutivas: esporozoítos presentes em oocistos, taquizoítos, e bradizoítos no interior de cistos teciduais (Figura 1). Os zoítos contêm organelas encontradas somente em *Apicomplexa*: conoide sustenta o citoesqueleto microtubular do parasito; apicoplasto é um plastídeo não fotossintético delimitado por 4 membranas; micronemas produz proteínas MIC que estão envolvidas no reconhecimento e na adesão nas células do hospedeiro; roptrias produz proteínas ROP que orientam a instalação do parasito dentro da célula do hospedeiro; grânulo denso produz proteínas GRA que estão envolvidas na manutenção do vacúolo parasitóforo onde o parasito multiplica.



**Figura 1. Formas evolutivas de *Neospora caninum*.** (A) Taquizoíto, (B) bradizoíto, (C) cistos teciduais, (D) oocistos não-esporulados, e (E) oocistos esporulados com dois esporocistos (seta) e dois esporozoítos (cabeça da seta). Conoide (Co); apicoplasto (Ap); micronemas (Mn); roptrias (Rh); grânulo denso (Dg). Fonte: (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013)

O parasito apresenta ciclo de vida heteroxênico, no qual os canídeos são hospedeiros definitivos e animais homeotérmicos são hospedeiros intermediários. *N. caninum* foi descrito

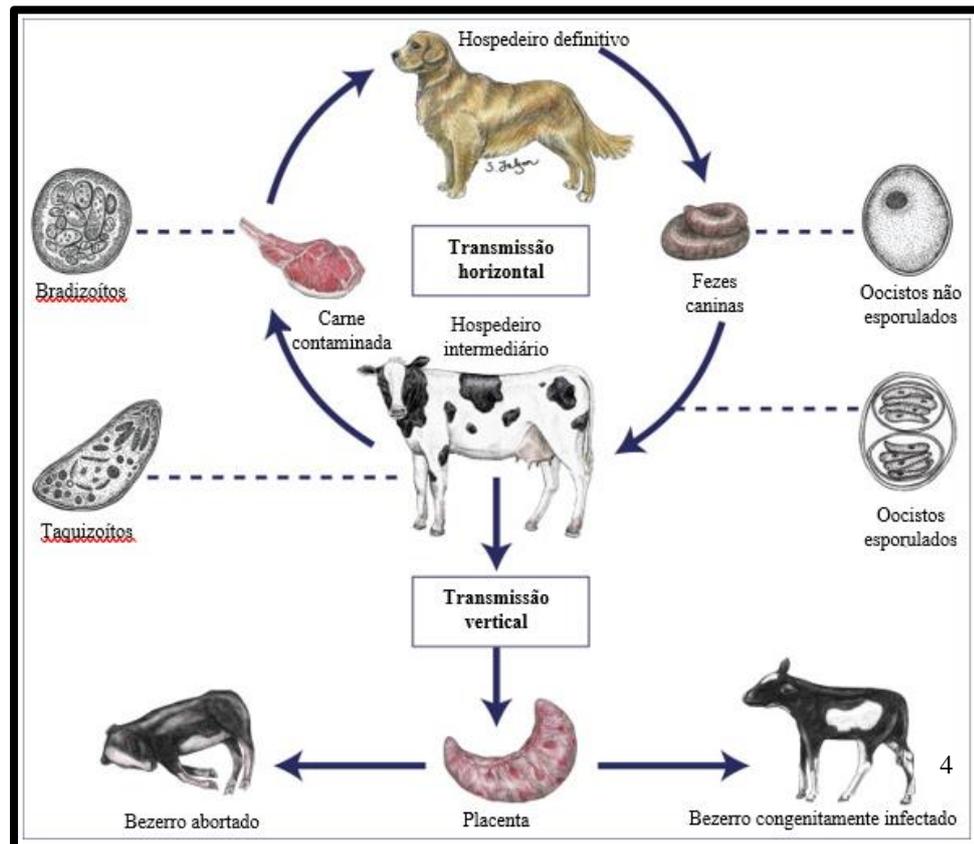
em 1988 (DUBEY *et al.*, 1988) e nas últimas décadas começou a ser mais compreendido, visto que a neosporose é uma das principais causas de abortamento em bovinos acarretando considerável perda econômica na pecuária (DUBEY, 2003; REICHEL *et al.*, 2014).

Em parasitos filogeneticamente próximos ao *N. caninum*, como o *Toxoplasma gondii*, a adesão entre parasitos e células do hospedeiro é mediada por antígenos de superfícies (SAGs), com subsequente liberação de adesinas pela ação dos micronemas, as quais desenvolvem um papel importante para o ataque a membrana plasmática do hospedeiro, acompanhada por extensivas modificações proteolíticas de proteínas associadas à entrada na célula (BINDER; LAGAL; KIM, 2008; CARRUTHERS; BLACKMAN, 2005). Em seguida, proteínas de roptrias são liberadas na interface celular parasito-hospedeiro, formando uma junção entre a membrana plasmática do parasito invasor e da célula do hospedeiro (BRADLEY; SIBLEY, 2007). Após a fusão, ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo (PV). Finalmente, estes parasitos modificam o ambiente no PV por secreção de proteínas de grânulos densos, tornando o ambiente propício para a replicação parasitária por endodiogenia, processo de desenvolvimento assexuado (VONLAUFEN *et al.*, 2004). Com a pressão realizada pela resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos de *N. caninum* se transformam em bradizoítos (EASTICK; ELSHEIKHA, 2010)

Os bradizoítos podem formar cistos teciduais e possuem replicação assexuada lenta, o que caracteriza formas de latência do parasito que podem persistir por toda vida em um hospedeiro sem causar qualquer sinal clínico, sendo mais comumente encontrado em tecidos nervosos e musculares (DUBEY; LINDSAY, 1990). A fase sexuada se inicia com a ingestão de cistos teciduais, presentes em tecidos da presa, por canídeos, os quais sobrevivem a passagem pelo estômago, mas liberam bradizoítos que infectam as células epiteliais do intestino delgado, onde ocorre a reprodução sexuada, formando esporozoítos e, posteriormente, oocistos no intestino do cão, sendo eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo e disseminados no ambiente. Os oocistos são resistentes aos fatores ambientais e resistem a variações climáticas por longos períodos, tornando-se infectantes (esporulados) mediante exposição ao oxigênio, temperatura e umidade. A ingestão desses oocistos esporulados pelo hospedeiro intermediário libera esporozoítos no intestino do hospedeiro, transformando-se em taquizoítos e infectando demais órgãos e tecidos (INNES, 2007).

*N. caninum* também pode ser transmitido por via transplacentária em bovinos (Figura 2) (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013), sendo que esse tipo de transmissão pode ser

dividido em duas diferentes vias, sendo transmissão transplacentária exógena ou endógena. A primeira via ocorre quando vacas prenhas adquirem a infecção após a ingestão de alimentos contaminados com oocistos, infectando subsequentemente tecidos fetais. A segunda via ocorre devido a recrudescência pela reativação e reconversão de bradizoítos em taquizoítos durante a prenhez e subsequente infecção fetal (TREES; WILLIAMS, 2005).



**Figura 2. Ciclo do *Neospora caninum*.** O ciclo de vida completo inclui tanto a replicação sexuada (em hospedeiros definitivos canídeos) e replicação assexuada em hospedeiros intermediários (ex.: bovinos). Transmissão horizontal (normalmente via oocistos e cistos teciduais). (Adaptado de GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013)

## 1.2 Patogênese e patologia

*N. caninum* pode infectar uma ampla gama de animais e causa doenças principalmente em bovinos e cães, embora não cause doença em humanos (DUBEY; LINDSAY, 1996). A patogênese da neosporose está associada com a invasão e a rápida multiplicação intracelular de taquizoítos, disseminados pela corrente sanguínea e sistema linfático, causando também inflamação tecidual (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Em bovinos, quando *N. caninum* infecta a placenta, multiplica-se promovendo a destruição tanto do tecido fetal quanto maternal, promovendo resposta inflamatória incompatível com um processo gestacional de sucesso (BARR et al., 1994). Não há desordens neurológicas identificadas em bovinos adultos pela neosporose, porém bezerros infectados intrauterinamente podem apresentar sintomatologia compatível (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Em cães, a doença pode se desenvolver em qualquer idade, a qual pode ser generalizada, envolvendo todos os órgãos (incluindo a pele), ou em locais específicos (BARBER; TREES, 1996). Os casos mais severos de neosporose são descritos em filhotes congenitamente infectados, os quais apresentam como sinais clínicos patognomônicos uma paresia dos membros posteriores (DUBEY; SCHARES, 2011). Outras disfunções que a neosporose pode desencadear incluem a dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e até insuficiência cardíaca (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

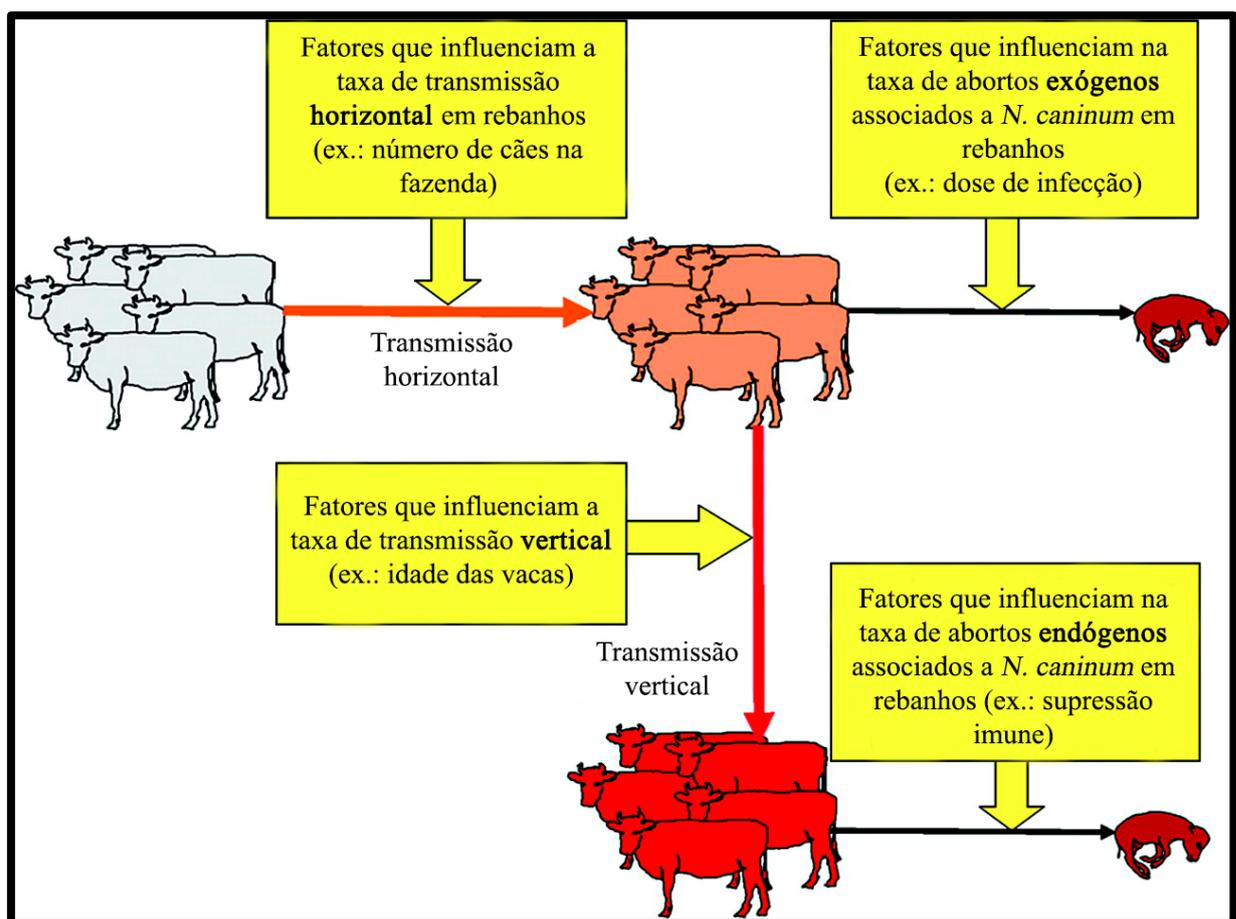
### **1.3 Epidemiologia**

Para entender a epidemiologia do *N. caninum*, é importante identificar seus hospedeiros e, também, entender sobre a distribuição geográfica. Há relatos de isolamento de *N. caninum* em animais como bovinos (MCALLISTER; WALLACE; BJORKMAN, 2005), ovelhas (PENA et al., 2007), cães (DUBEY et al., 2004), veados (GONDIM et al., 2004), búfalos (RODRIGUES et al., 2004), raposas vermelhas (ALMERÍA et al., 2002), texugo, doninha, furão (BARTLEY et al., 2013), urubu (DARWICH et al., 2012), guaxinim (LEMBERGER et al., 2005) e dunnart (KING et al., 2011).

Casos de neosporose são mais expressivos em bovinos, sendo o abortamento uma das principais consequências clínicas, apresentando caráter esporádico, endêmico ou epidêmico (DONAHOE et al., 2015; DUBEY, 2003; MCALLISTER, 2016). O abortamento de fetos gera perdas econômicas que podem ultrapassar bilhões de dólares anualmente (INNES et al., 2005; REICHEL et al., 2014; WILLIAMS et al., 2000). Dependendo da fase da gestação em que ocorre a infecção intrauterina, além da rejeição fetal, a infecção pelo parasito pode gerar lesões degenerativas ou inflamatórias no feto, natimorto ou fetos mumificados, nascimento de bezerros fracos com sintomas no sistema nervoso central ou até nascimento de bezerros considerados saudáveis, mas infectados cronicamente (ANDRIANARIVO et al., 2001). Tais

sintomas dependem do estado imunológico contra *N. caninum* durante a transmissão vertical (KHAN et al., 1997; QUINN; ELLIS; SMITH, 2002).

Presume-se que *N. caninum* pode ser encontrado em todas as regiões do mundo onde exista criação de gado, sendo que sua prevalência pode diferir entre países (DUBEY; SCHARES, 2011). A transmissão vertical da mãe para o feto e a ingestão pós-natal de oocistos são os únicos modos de transmissão demonstradas em bovinos (Figura 3). *N. caninum* é um dos parasitos mais eficientemente transmitidos por via transplacentária entre todos os microrganismos conhecidos no gado (WILLIAMS et al., 2000).



**Figura 3.** Visão geral do risco potencial ou fatores de proteção que influenciam a transmissão horizontal ou vertical de *Neospora caninum* e a ocorrência de abortos exógenos ou endógenos associados a *N. caninum*. Nesse diagrama, vacas naïve estão coloridas em cinza, vacas infectadas pós-natal estão coloridas em laranja e vacas infectadas verticalmente estão coloridas em vermelho. (Adaptado de DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007)

## 1.4 Resposta imune celular

A combinação da resposta imune inata com a resposta imune adaptativa pode controlar a infecção por *N. caninum*. A resposta imune humoral, apesar de poucos relatos, está relacionada com o bloqueio de taquizoítos extracelulares, havendo mais informações sobre a resposta imune celular contra *N. caninum* (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Após a infecção, os padrões associados ao patógenos (PAMPs), presentes em parasitos, são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes em células da imunidade inata e desencadeiam respostas inflamatórias (HOU et al., 2011; MANSILLA; CAPOZZO, 2017; THAISS et al., 2016). Os PRRs mais bem caracterizados são os receptores do tipo Toll (TLRs), sendo alguns presentes na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) e outros em endossoma (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13) (DE NARDO, 2015; VIJAY, 2018). Estes receptores apresentam um papel importante na ativação do sistema imune inato durante a infecção por *N. caninum*, por meio das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF. A partir da sinalização dependente de MyD88 e TRIF, ocorre a ativação de fatores de transcrição, como NFκB, responsáveis por gerar mediadores pró-inflamatórios da resposta imune como IL-12 e IFN-γ, essenciais para o controle da infecção por *N. caninum* (DOS SANTOS MIRANDA et al., 2019; MINEO et al., 2009b).

Os receptores do tipo NOD (NLRs) também participam da resposta imune contra o *N. caninum*, sendo que a via de sinalização ativada por NOD-2, que é colocalizado com o vacúolo parasitóforo, atua no controle da replicação do parasito *N. caninum*, entretanto, intensifica a inflamação, gerando grave patogênese e morte do hospedeiro (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). Este perfil deletério também foi observado para o receptor dectina-1, visto que camundongos geneticamente deficientes para essa molécula apresentaram resistência a infecção por *N. caninum* assim como alta produção de IL-12p40 (DA SILVA et al., 2017).

Estudos *in vitro* apresentaram que em macrófagos peritoneais derivados da medula óssea de camundongos infectados com taquizoítos de *N. caninum* ocorre a ativação do receptor NLRP3 do inflamassoma, um complexo multiproteico importante na detecção de patógenos, associado com a liberação de IL-1β e IL-18, clivagem de caspase-1 e morte celular. Ademais, em infecções em camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC e caspase-1/11 resultou em baixas produções de IL-18 e IFN-γ no soro, infiltrado inflamatório e altas cargas parasitárias no sítio de infecção, apontando o papel desse receptor no controle da replicação do parasito (WANG et al., 2018).

Ademais, a resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra o parasito *N. caninum*, desempenhando um papel importante para seu controle, e também participa da indução da resposta imune adaptativa, podendo restringir a proliferação parasitária e até mesmo levar à resistência ao parasito. Como exemplo, durante a fase aguda da neosporose ocorre a produção de interleucina 12 (IL-12) secretada por células dendríticas, a qual estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células *natural killer* (NK) e linfócitos T, demonstrando a importância desses mecanismos para a sobrevivência do hospedeiro (ALMERÍA; SERRANO-PÉREZ; LÓPEZ-GATIUS, 2017; HEMPHILL et al., 2013; MONNEY; HEMPHILL, 2014; NISHIKAWA, 2017).

Além disso, durante infecções, um componente da resposta imune inata que participa do reconhecimento do patógeno são as lectinas. A interação funcional entre as lectinas e seus receptores de carboidratos “próprios” e “não próprios” estão implicados em vários aspectos da resposta imune de vertebrados e invertebrados e foram caracterizados em detalhes nos últimos anos (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; LIU; RABINOVICH, 2005; LUDWIG; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2006).

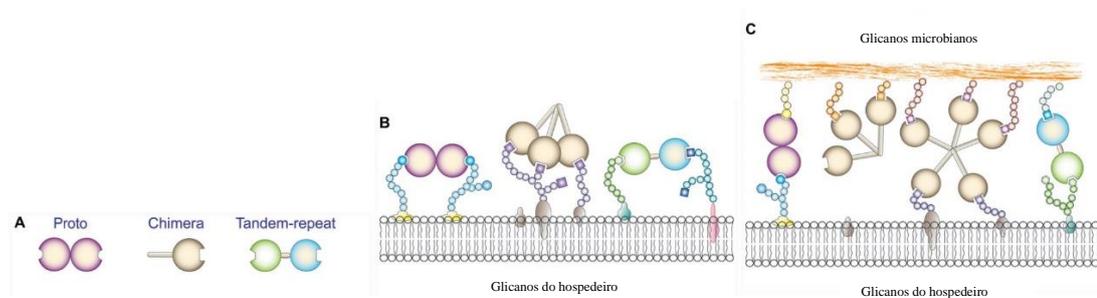
## 1.5 Galectinas

Atualmente está bem estabelecido que lectinas do tipo C, ficolinas e galectinas não possuem apenas um papel importante em processos imunes inatos que levam ao reconhecimento do patógeno, endocitose, ativação do complemento e processamento de antígeno, mas também estão envolvidos nas funções imunes adaptativas, incluindo a seleção clonais de células B e T, maturação, ativação, e apoptose (VASTA; AHMED, 2009).

O receptor inato de lectina tipo C, como dectina-1, foi relatado como relevante na infecção por *N. caninum*, sendo importante na taxa de mortalidade dos animais infectados, no parasitismo durante a fase crônica e aguda da infecção, e também na produção de citocinas importante para o controle do parasito, como IL-12p40 (DA SILVA et al., 2017).

As galectinas constituem a família de lectinas de animais definidas por sua afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, contendo um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD). Os membros da família das galectinas são amplamente distribuídos em táxons eucarióticos desde fungos e esponjas até linhagens de metazoários protostômios e deuterostômios e do ponto de vista estrutural são notavelmente conservados (COOPER, 2002; VASTA et al., 1999).

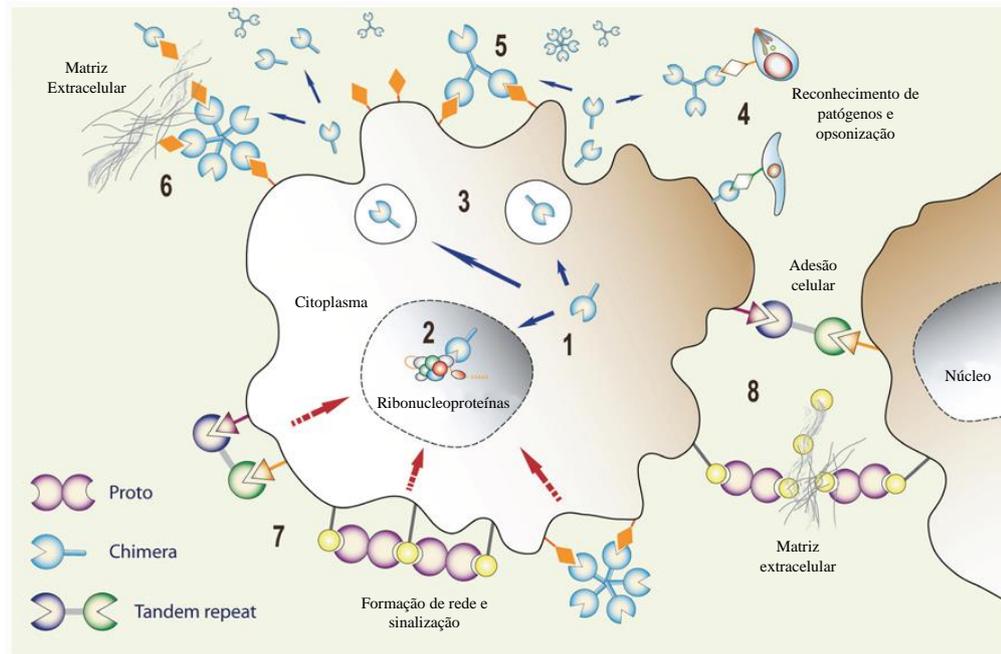
Baseado em suas organizações de domínio, as galectinas têm sido classificadas em três tipos: “proto”, “chimera” e “tandem-repeat” (HIRABAYASHI; KASAI, 1993) (Figura 4). As galectinas do tipo “proto” contém 1 CDR por subunidade e são homodímeros ligados não covalentemente. As galectinas “chimera” têm um CDR C-terminal e um domínio N-terminal rico em prolina e glicina. Nas galectinas “tandem-repeat”, dois CDRs estão conectados por um peptídeo (TASUMI; VASTA, 2007). Repetições do tipo “proto” e “tandem” podem ter reações cruzadas entre glicanos do hospedeiro e do micróbio. Ademais, glicanos “chimera” (galactin-3) podem reconhecer glicanos de micróbios, mas ainda não está totalmente claro que eles também façam reações cruzadas com a superfície da célula do hospedeiro (VASTA; AHMED, 2012).



**Figura 4. Reconnhecimento pelas galectinas.** (A) Representação esquemática da organização dos domínios das galectinas; (B) Ilustração esquemática das interações cis das galectinas “proto”, “chimera”, e “tandem” com glicanos da superfície da célula de hospedeiros. (C) Ilustração esquemática de interações trans das galectinas “proto”, “chimera” e “tandem” com glicanos de micróbios ou da superfície da célula do hospedeiro. (Adaptado de Vasta; Ahmed, 2012)

Embora relativamente conservadas do ponto de vista estrutural, as galectinas apresentam uma alta diversidade funcional. A expressão, secreção e diversidade funcional das galectinas estão representadas na figura 5, onde os transcritos de galectina são traduzidos no citoplasma e a proteína pode ser translocada para o núcleo, onde elas podem associar com ribonucleoproteínas. Por mecanismos não convencionais, as galectinas podem ser secretadas para o meio extracelular, onde podem funcionar como receptores de reconhecimento de padrões para glicanos de micróbios, ligar a glicanos de superfície de células do hospedeiro, e ter reações cruzadas com glicanos da matriz extracelular, por exemplo, promovendo a migração celular. Galectinas também podem fazer ligações cruzadas com glicanos de superfície celular e induzir agrupamento de microdomínios e formação de rede na superfície celular que pode desencadear

cascatas de sinalização, ou reações cruzadas com células vizinhas e promover a adesão/interação entre células (VASTA; AHMED, 2012).



**Figura 5. Expressão, secreção e diversidade funcional das galectinas.** (1) Os transcritos de galectina são traduzidos no citoplasma e a proteína pode ser translocada para o núcleo (2) onde elas podem associar com ribonucleoproteínas. Por mecanismos não convencionais, as galectinas podem ser secretadas para o meio extracelular (3) onde podem funcionar como receptores de reconhecimento de padrões para glicanos de microrganismos (4), ligar a glicanos da superfície de células do hospedeiro (5), e ter reações cruzadas com glicanos da matriz extracelular (6), por exemplo, promovendo a migração celular. Galectinas também podem fazer ligações cruzadas com glicanos da superfície celular e induzir agrupamento de microdomínios e formação de rede na superfície celular (7) que pode desencadear cascatas de sinalização, ou reações cruzadas com células vizinhas (8) e promover a adesão/interação entre células. (Adaptado de Vasta; Ahmed, 2012)

Alguns tipos de galectinas têm sido reportadas como mediadores de adesão celular (WALLIS, 2002; WEIS et al., 1998), diferenciação de células B (HE; BAUM, 2004; MARTINEZ et al., 2004), inflamação (RUBINSTEIN et al., 2004), em processos de “splicing” de mRNA (PATTERSON; WANG; WANG, 2004), apoptose de leucócitos (PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998; RABINOVICH et al., 2002) e metástase de câncer (LIU; RABINOVICH, 2005; TAKENAKA; FUKUMORI; RAZ, 2004). Além disso, recentemente foi reconhecido que as galectinas do hospedeiro podem ligar-se diretamente a resíduos de carboidrato disposto na superfície de parasitos, como lipofosfoglicanos (LPG) (PELLETIER et al., 2003; PELLETIER; SATO, 2002), e funcionar como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs).

## 1.6 Resposta imune humoral

A resposta imune humoral também desempenha um papel importante no controle da infecção por *Neospora caninum*. Em experimentos utilizando camundongos, foi demonstrado que células B peritoneais e do baço foram ativadas na infecção aguda por *N. caninum*. Células B naïve também se tornaram ativadas quando estimuladas com *N. caninum in vitro* (TEIXEIRA et al., 2005).

Pesquisas demonstram que em camundongos deficientes na produção de células CD4<sup>+</sup> e infectados por *N. caninum* apresentaram uma maior mortalidade, menores níveis de IgG no dia 9 após a infecção e, também, houve uma maior razão IgG1/IgG2a quando comparados a camundongos não depletados (NISHIKAWA et al., 2001; SPENCER et al., 2005; TANAKA et al., 2000).

Quanto ao quesito de anticorpos auxiliarem o controle da neosporose, já foi relatado *in vitro* que anticorpos presentes no soro de camundongos infectados por *N. caninum* apresentaram uma atividade na inibição da invasão celular pelo parasito (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2010). Também há evidências de que IgG específico para proteínas da membrana de *N. caninum* interferem na sobrevivência de taquizoítos em macrófagos *in vitro* (FERREIRINHA et al., 2014).

Também há relatos de que camundongos imunizados com taquizoítos transgênicos apresentaram altas taxas de proteção contra a transmissão de *N. caninum* via transplacentária (MARUGÁN-HERNÁNDEZ et al., 2011), demonstrando a importância da indução da produção de anticorpos específicos para o controle da neosporose.

## 1.7 Modelos animais de infecção

A fim de elucidar parâmetros imunes, patológicos e sobre a virulência da infecção por *N. caninum*, as infecções experimentais são de grande valia. Diferentes modelos de infecção têm sido utilizados no campo da pesquisa, auxiliando na avaliação da relação parasito-hospedeiro. Os bovinos, que são hospedeiros intermediários mais importantes por apresentarem grande interesse econômico na infecção por *N. caninum*, são utilizados em infecções experimentais com sucesso (MALEY et al., 2006), todavia o manejo desses animais pode ser custoso, exigindo

maiores habilidades e necessidade de grandes instalações (DE MAREZ et al., 1999; HORCAJO et al., 2016). Por outro lado, as ovelhas também podem ser apresentadas como um modelo experimental interessante por serem hospedeiras naturais, serem ruminantes, e apresentarem sistema imunológico semelhante aos bovinos. Ademais, o uso destes animais pode apresentar vantagens em relação aos bovinos, como a necessidade de um espaço menor para a criação, a facilidade de manuseio e o período gestacional mais curto que as vacas (ARRANZ-SOLÍS et al., 2015; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2018).

Os estudos de infecção experimental para estudo da neosporose utilizando camundongos são maioria, sendo que estes animais apresentam facilidade no manuseio, acessibilidade, e baixo custo (HEMPHILL; AGUADO-MARTÍNEZ; MÜLLER, 2016), apesar de apresentarem algumas diferenças no sistema imune, bem como susceptibilidade limitada com relação aos hospedeiros naturais. Estes animais já demonstraram ser um modelo viável para estudo da infecção por *N. caninum* (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006b), apresentando características clínicas semelhantes aos hospedeiros infectados naturalmente, como perdas reprodutivas (LONG; BASZLER, 1996), e eficiência na transmissão vertical (LIDDELL; JENKINS; DUBEY, 1999), mimetizando os efeitos da infecção experimental em bovinos.

## 2. JUSTIFICATIVA

A neosporose é uma doença que pode acometer animais, incluindo bovinos, gerando uma grande perda econômica tanto na população de gado de corte quanto de gado de leite. Sendo assim, o melhor entendimento da resposta imunológica contra *N. caninum* se torna crucial para o desenvolvimento de tratamentos terapêuticos ou profiláticos. O uso de modelos experimentais, como camundongos, possibilita o entendimento dessa infecção, sendo que a via intraperitoneal é a mais utilizada para o estabelecimento da infecção nas pesquisas científicas, podendo propiciar um entendimento preciso sobre o processo de infecção e compreender os mecanismos fisiopatológicos durante a infecção por *N. caninum*. Como não há pesquisas relacionadas com a importância da galectina-3 em camundongos infectados por *N. caninum*, torna-se crucial o estudo dessa molécula na infecção pelo parasito, a fim de elucidar mais os parâmetros imunológicos envolvidos na resposta contra esse parasito.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Determinar o papel de galectina-3 no modelo de infecção intraperitoneal por *N. caninum* induzido em camundongos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- A.** Determinar o papel de galectina-3 em parâmetros de morbidade e mortalidade no modelo de infecção intraperitoneal por *N. caninum* induzido em camundongos.
- B.** Determinar a importância de galectina-3 na histopatologia e no parasitismo da infecção por *N. caninum* pela via intraperitoneal em camundongos.
- C.** Determinar a relevância de galectina-3 para a indução da produção de anticorpos mediante a infecção intraperitoneal por *N. caninum*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes para a galectina-3 (*Gal3<sup>-/-</sup>*), com 6-8 semanas de idade, foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22-25°C) e alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos utilizando camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU); número de protocolo 109/16 e foram realizados de acordo com as recomendações no Guia de Princípios para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais do Conselho Internacional para Ciência de Animais de Laboratório (ICLAS), referendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O local de experimentação animal (Rede de Biotérios de Roedores – REBIR-UFU) é credenciado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA, CIAEP: 01.0105.2014) e Biossegurança (CTNBio, CQB: 163/02).

### 4.2 Parasitos

Para o cultivo dos parasitos, linhagem de fibroblastos murinos NIH/3T3 (ATCC, USA) foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI 1640 (Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA) suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), 100 U/mL penicilina (Gibco), 100 ug/mL estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, até atingir confluência.

Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* (isolado NcLiv), mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas para células, exceto pela adição de SFB ao meio. Após a lise celular, as suspensões foram obtidas conforme descrito previamente (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016). O sobrenadante contendo a suspensão parasitária foi coletado e centrifugado a 800 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI 1640 e os parasitos contados em câmara hemocitométrica (Neubauer) com o auxílio do corante Azul de Tripán 0,4% (Sigma Chemical Cp., St. Louis, EUA) sendo utilizado logo em seguida para infecção de camundongos.

### 4.3 Desenho experimental

Para investigar a inflamação tecidual causada pelo *N. caninum*, o parasitismo e a produção de anticorpos, camundongos WT e *Gal3<sup>-/-</sup>* foram divididos em 4 grupos (5 camundongos WT e 5 camundongos *Gal3<sup>-/-</sup>* por grupo): grupo não infectado (N.I.) para a coleta de soro para posterior análise de anticorpos específicos anti-*N. caninum* pelo método de ELISA. 01 grupo infectado pela via intraperitoneal com  $1 \times 10^7$  taquizoítos de *N. caninum* por 30 dias para análise de parâmetros de morbidade e taxa de mortalidade. 01 grupo infectado pela via intraperitoneal com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* por 07 dias, sendo que após o tempo de infecção, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a obtenção dos pulmões e dos fígados para posterior análise histológica. 01 grupo infectado pela via intraperitoneal com  $1 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* por 30 dias para a coleta de cérebro, tanto para análise histológica quanto para a análise do parasitismo por PCR em tempo real, e soro para a análise da produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum* pelo método de ELISA.

### 4.4 Parâmetros de morbidade

Para analisar o impacto da infecção nos animais, camundongos WT e *Gal3<sup>-/-</sup>* foram infectados com  $1 \times 10^7$  taquizoíto de *N. caninum* e acompanhados diariamente. O peso e a piloereção e atividade desses animais foram avaliadas todos os dias após a infecção, durante 30 dias. Para a análise de morbidade, os animais foram observados diariamente e foram ranqueados, como anteriormente descrito (BARTLEY et al., 2006) com modificações, sendo: camundongo ativo e sem piloereção (Score 0); camundongos com piloereção (Score 1); camundongos relutantes para mover (Score 2).

### 4.5 Quantificação de parasitos

A carga parasitária no cérebro foi determinada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR-StepOne Plus, Applied Biosystems, EUA) através do sistema de detecção SYBR green (Promega, Madison, EUA) e normalizados para Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), assim como descrito anteriormente (JOHNSON II; WIDLANSKI, 2003). Brevemente, DNA foi extraído de 100 mg de tecido cerebral usando 500  $\mu$ L de tampão NLB (10mM Tris-HCl, 400nM NaCl e 2mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,2), 16  $\mu$ L de SDS 10% e 8  $\mu$ L de Solução proteínase K (20mg/mL) e incubados a 50°C *overnight*. Após incubação, 150  $\mu$ L de tampão NaCl 6M foi adicionado às amostras seguido pela incubação em gelo por 10 minutos e posterior centrifugação a  $12.000 \times g$  durante 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado, transferido para outro tubo e acrescentou-se 800  $\mu$ L de etanol absoluto. O DNA foi

coletado e ressuspendido com 150-200 µL de água livre de nucleases. As concentrações de DNA das amostras foram determinadas por espectrofotometria (260 nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e ajustadas para 40 ng/µL com água livre de DNase (água DEPC) para ensaios de qPCR, o qual foi utilizado primers desenhados para a sequência de Nc5 de *N. caninum* (*Forward*: GCTGAACACCGTATGTCGTAAA; *Reverse*: AATCTCCACTTTGCCACTGCA). O parasitismo foi estimado pela extrapolação de número de cópias de Nc5 na amostra comparado com curvas padronizadas com DNA obtido de um número conhecido de taquizoítos de *N. caninum*, usando determinado equipamento e seu software (Step One Plus, Thermo Scientific, USA).

#### **4.6 Análises histológicas**

Amostras de pulmão e fígado dos animais infectados por 7 dias e cérebro dos animais infectados por 30 dias foram coletadas de camundongos WT e *Gal3<sup>-/-</sup>* e analisados quanto a infiltrados inflamatórios e dano tecidual. Para isso, os órgãos foram fixados em formalina tamponada a 10% à temperatura ambiente por 24 horas e armazenados em álcool 70% até o processo de inclusão em parafina. Após a inclusão, os órgãos parafinados foram seccionados (5µm de espessura) e depositados em lâminas microscópicas, seguido pela desparafinização e hidratação para a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), como descrito por (MINEO et al., 2009a), sendo avaliados alterações morfológicas teciduais. O score de dano tecidual foi baseado em uma escala de 0 a 3, de acordo com um procedimento publicado anteriormente (GIBSON-CORLEY; OLIVIER; MEYERHOLZ, 2013). A aquisição de imagens foi feita usando um microscópio invertido automático (FSX100, Olympus, Japan).

#### **4.7 Preparação de antígeno solúvel de *N. caninum***

Antígenos solúvel de *N. caninum* (NLA) foram preparados de acordo com métodos já descritos (MOTA et al., 2016). Brevemente, suspensões parasitárias foram tratadas com coquetel de inibidores de protease (Complete Mini, Roche, Alemanha) e submetidas a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido de sonicação durante cinco minutos a 60Hz em banho de gelo. Posteriormente parasitos lisados foram submetidos à centrifugação (10.000 × g, 30 min, 4°C). O sobrenadante resultante foi coletado e a concentração proteica quantificada utilizando o método de Bradford (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (BRADFORD, 1976). Alíquotas de NLA foram armazenados a -20°C até sua utilização nos procedimentos de ELISA.

#### 4.8 ELISA indireto para IgG anti-*N. caninum*

Ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) foi feito para detectar a cinética de anticorpos IgG específicos anti-*N. caninum* em soro de camundongos WT e *Gal3<sup>-/-</sup>* infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* por 30 dias e de camundongos não infectados, seguindo o protocolo já descrito com algumas modificações (MINEO et al., 2010).

Placas de alta afinidade de 96 poços (Corning Incorporates Costar®, New York, USA) foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *N. caninum* (NLA, 10 µg/ mL em 0,06 M de tampão carbonato (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. A placa foi lavada com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) e sítios não específicos foram bloqueados com leite em pó desnatado em PBS-T (PBS-TM) a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Depois das lavagens, as amostras de soro dos animais infectados foram adicionadas, em duplicata, com diluição 1:25 em 1% de PBS-TM por 1 hora. Posteriormente, a placa foi lavada e foi adicionado o anticorpo secundário (IgG anti-camundongo), marcado com peroxidase, com diluição de 1:1000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), diluído em PBS-T + BSA 1% e incubada por 1 hora a 37°C. Após o último ciclo de lavagem, foi adicionado o substrato da enzima (0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em tampão de cromógeno ácido 2,21-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico 0,01 M (ABTS; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) em 0,07 M de tampão citrato-fosfato (pH 4,2). Após a incubação de 20-30 minutos a temperatura ambiente, a densidade ótica (D.O.) foi determinada no leitor de placas a 405 nm. O ponto de corte da reação foi determinado pelos valores médios de D.O. dos soros controle negativo acrescidos de 3 desvios padrão. Os títulos de anticorpo foram expressos em D.O.

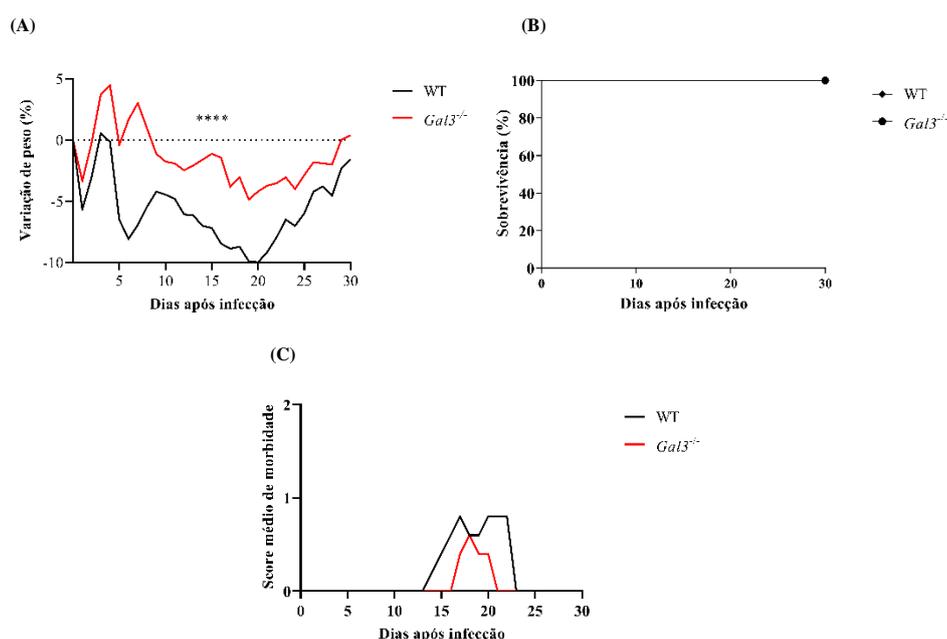
#### 4.9 Análises estatísticas

Gráficos e cálculos estatísticos serão realizados usando o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelos testes de One-way ANOVA utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni, Kruskal-Wallis utilizando o teste de comparação múltipla de Dunn e teste de Mann-Whitney, quando apropriado. A porcentagem de sobrevivida de camundongos foi estimada usando o método de Kaplan-Meier, seguido pela comparação das curvas de sobrevivida através do teste de log-rank – Mantel-Cox. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Valores para  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Galectina-3 está relacionada com a perda de peso corporal em animais

Com o propósito de verificar a importância direta de galectina-3 na sobrevivência do hospedeiro, camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> foram infectados com taquizoítos de *N. caninum* (1x10<sup>7</sup> taquizoítos por animal) e monitorados por 30 dias para avaliar a morbidade (Figura 6A e 8C) e sobrevivência (Figura 6B). Em média, animais geneticamente deficientes para galectina-3 apresentaram uma menor perda de peso corporal, mesmo sem mortes em ambos os grupos.

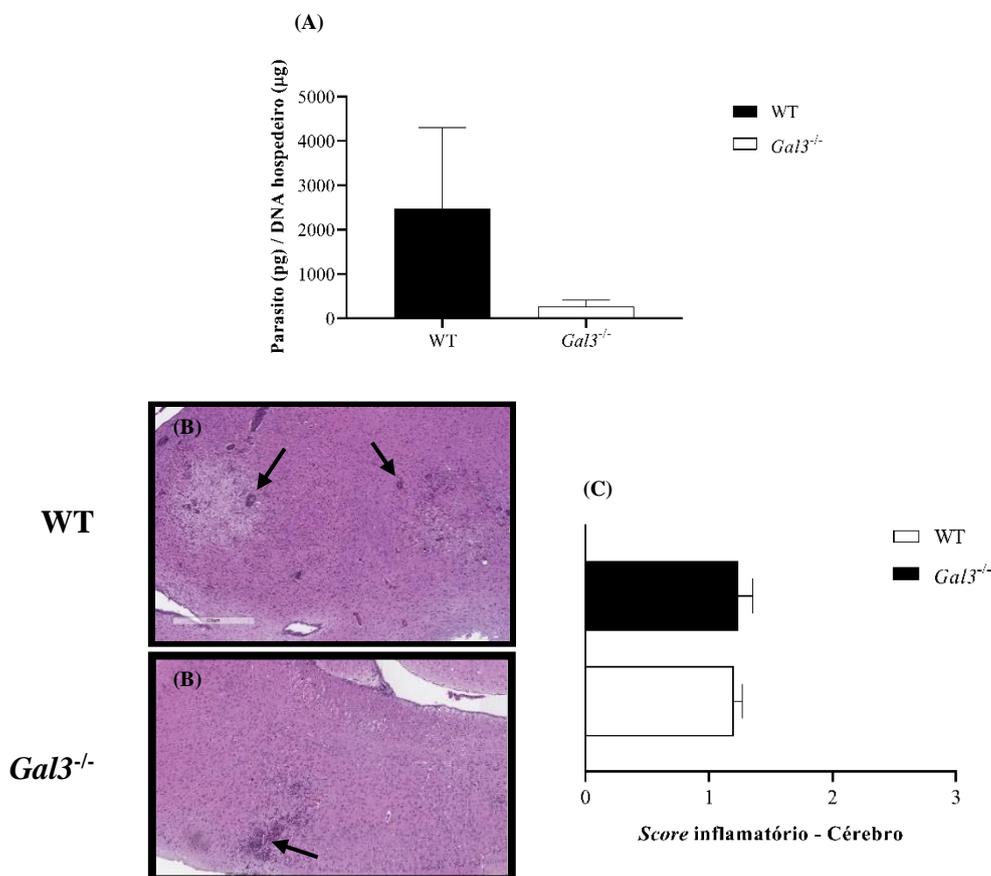


**Figura 6. Galectina-3 está relacionada com a variação de peso corporal na infecção por *N. caninum*.** (A) variação de peso, (B) mortalidade e (C) score médio de morbidade, onde score 0 – camundongos ativos e sem poliereção; 1 – camundongos com piloereção; 2 – camundongos relutantes para mover, de camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> infectados com 1x10<sup>7</sup> taquizoítos de *N. caninum* e monitorados por 30 dias após a infecção. Curvas de sobrevivência foram comparadas usando análise de Kaplan-Meier e teste Matel-Cox log-rank (\*\*\*\* P < 0,0001).

### 5.2 A produção de galectina-3 não tem influência na replicação parasitária no cérebro e na inflamação tecidual.

Para verificar a ação da galectina-3 no controle da replicação parasitária *in vivo*, camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> foram infectados com uma dose subletal (5x10<sup>6</sup> taquizoítos por animal) de *N. caninum* por 30 dias. Além disso, foi analisado a inflamação (Figura 7B) no cérebro desses animais. Na fase crônica da infecção foi observado que os cérebros dos animais *Gal3*<sup>-/-</sup> foram parasitados de forma semelhante quando comparado com o grupo WT. Ademais,

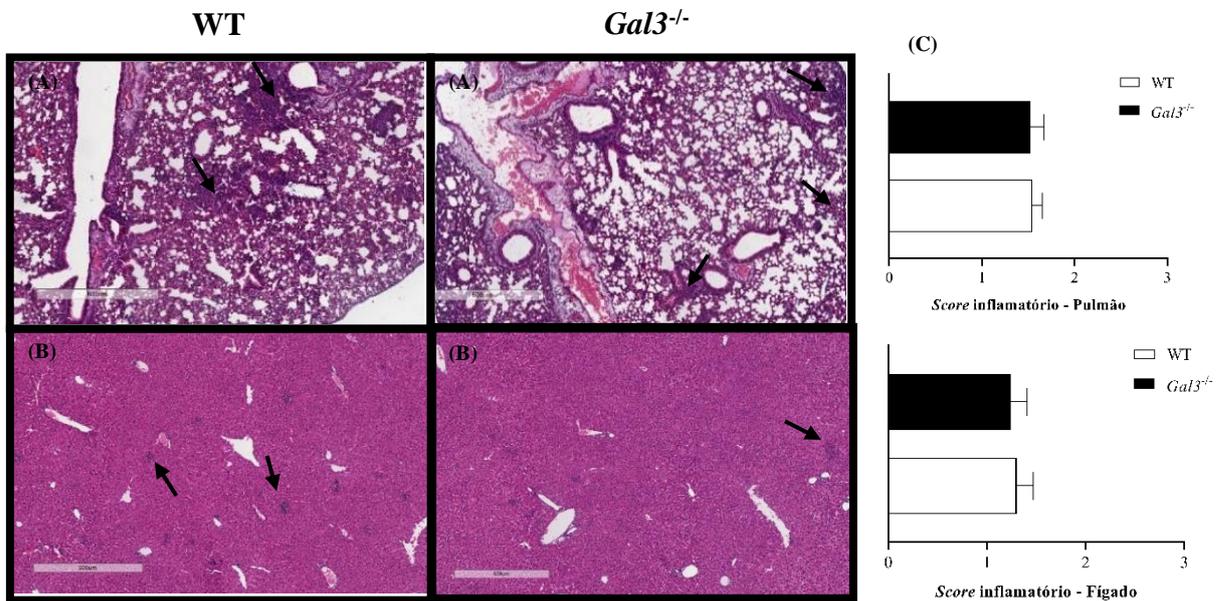
não houve diferença entre os animais WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> nas análises histológicas dos cérebros, com ambos os grupos apresentando infiltrado inflamatório.



**Figura 7. Galectina-3 não influencia na replicação parasitária *in vivo*.** (A) Quantificação da carga parasitária em camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup>. Camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> (n=5) foram infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* e feito a eutanásia para coleta de tecido cerebral em estágios de infecção crônica. Os valores foram obtidos a partir da reação qPCR por amplificação do gene Nc5. (B) representação histológica de cérebro de camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum*. (C) Score inflamatório de cérebros de camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> (n=5) infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum*. Tecido cerebral foi coletado durante a fase crônica (30 dias). As setas indicam áreas de infiltrado celular inflamatório. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas sob microscopia ótica (10x magnification). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

Quanto a inflamação tecidual em 07 dias de infecção, as fotomicrografias representativas do corte histológico (Figura 8) revelaram que os pulmões (Figura 8A) de ambos os grupos experimentais estavam consideravelmente alterados, apresentando infiltrado inflamatório difuso com células mono e polimorfonucleares. Por meio das análises histopatológicas do

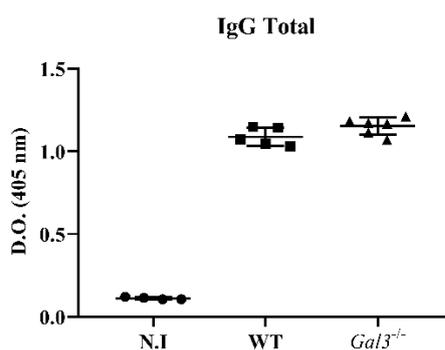
fígado (Figura 8B), também foi observado a presença de infiltrados inflamatórios variados e difusos, mesmo sem haver diferença nas análises histológicas entre os animais WT e *Gal3*<sup>-/-</sup>.



**Figura 8. Galectina-3 não controla a inflamação tecidual durante a infecção por *N. caninum*.** Fotomicrografias representativas do (A) pulmão, (B) fígado de camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum*. (C) Score inflamatório de cérebros de camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> (n=5) infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum*. Tecido pulmonar e do fígado foram coletados durante a fase aguda da infecção (7 dias). As setas indicam áreas de infiltrado celular inflamatório. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas sob microscopia ótica (10x magnification). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

### 5.3 Galectina-3 não interfere na produção de anticorpos anti-*N. caninum* em camundongos

A fim de compreender o envolvimento de galectina-3 na resposta imune humoral durante a infecção por *N. caninum*, foi analisada a produção de anticorpos IgG antígeno específicos no soro de camundongos WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> infectados com  $5 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* (Figura 9). Foi observado que a produção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* foi similar em ambos os grupos experimentais durante a fase crônica da infecção.



**Figura 9. A ação de galectina-3 não interfere na produção de IgG anti-*N. caninum*.** Quantificação da produção de anticorpos IgG anti-*N. caninum*, por ELISA, no soro de animais WT e *Gal3*<sup>-/-</sup> infectados com 5x10<sup>6</sup> taquizoítos de *N. caninum* por 30 dias. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas foram feitas entre os grupos WT e GAL-3<sup>-/-</sup> usando One-way ANOVA. N.I.: não infectado.

## 6. DISCUSSÃO

A infecção causada por protozoário está associada com a indução da imunidade inata, incluindo alguns receptores como galectina-3. Ademais, galectina-3 foi inicialmente associada com a ligação de glicanos próprios endógenos e mediar processos de desenvolvimento, incluindo diferenciação celular, organização de tecidos (LEFFLER et al., 2004) e, mais recentemente, regulação da homeostase imune (RABINOVICH; TOSCANO, 2009; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). Nos últimos anos, contudo, tornou-se claro que as galectinas também podem ligar-se a glicanos presentes na superfície de potenciais microrganismos patógenos e vermes parasitas, e mediar reconhecimento e funções efetoras na imunidade inata (SATO; NIEMINEN, 2004). Sendo assim, o princípio desse estudo foi elucidar como essas moléculas participam na resistência de camundongos infectados pelo protozoário *N. caninum*.

Para isso, foi utilizado camundongos selvagens (WT) e deficientes em galectina-3 (GAL-3<sup>-/-</sup>), sendo que foi reconhecido que as galectinas do hospedeiro podem ligar-se diretamente a resíduos de carboidratos presentes na superfície do parasito, e funcionar como PRRs (VASTA, 2009). Os grupos experimentais foram infectados com taquizoítos de *N. caninum* e sujeitos a análises de sobrevivência, infecção aguda (7 dias) e crônica (30 dias).

Primeiramente, nossos resultados indicaram que camundongos WT perderam maior porcentagem de peso corporal durante a infecção pelo *N. caninum*, quando comparado com os animais *Gal3*<sup>-/-</sup>. Mesmo que não haja relatos na literatura sobre o papel da molécula galectina-3 na infecção por *N. caninum*, em modelos experimentais murinos infectados por *Trypanosoma cruzi*, macrófagos depletados para galectina-3 demonstraram uma menor infectividade e

viabilidade. Além disso, camundongos deficientes para galectina-3 estão parcialmente protegidos contra a malária cerebral experimental (OAKLEY et al., 2009). Contrariamente, infecção por *T. gondii in vivo* com a cepa virulenta RH demonstrou que camundongos *Gal3<sup>-/-</sup>* tiveram menor probabilidade de sobreviver após a infecção (ALVES et al., 2013; BERNARDES et al., 2006).

Durante a infecção crônica por *N. caninum*, foi observado que os camundongos *Gal3<sup>-/-</sup>* não apresentaram diferença na carga parasitária em células do cérebro, principal órgão afetado pelo parasito de acordo com sua distribuição temporal anteriormente descrita (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2006a), quando comparado com o grupo WT. Esses resultados demonstram que galectina-3 não é importante para limitar a replicação parasitária no cérebro durante a infecção. Chain e colaboradores demonstraram que camundongos *Gal3<sup>-/-</sup>* tiveram uma melhor habilidade de eliminar o parasito e controlar a infecção na fase aguda da doença de Chagas (CHAIN et al., 2020). Ademais, em modelos de infecção por malária, camundongos *Gal3<sup>-/-</sup>* tiveram uma baixa parasitemia em estágios da fase aguda (TOSCANO et al., 2012) e crônica (OAKLEY et al., 2009) quando comparados com o grupo WT. Além disso, o sistema nervoso central de animais *Gal3<sup>-/-</sup>* infectados por *T. gondii* exibiu uma alta carga parasitária quando comparada com camundongos WT (BERNARDES et al., 2006).

No presente estudo, também foi avaliado a presença de dano tecidual por análises histológicas de camundongos WT e *Gal3<sup>-/-</sup>* e foi observado que na falta da ação da galectina-3 não houve diferença no número de focos inflamatórios no fígado, cérebro e pulmão desses animais quando comparados ao grupo WT. Em modelos de infecção por *T. gondii*, Bernardes e colaboradores demonstraram que os camundongos *Gal3<sup>-/-</sup>* tiveram uma menor resposta inflamatória no fígado, mas uma alta resposta inflamatória nos pulmões quando comparado com os camundongos WT (BERNARDES et al., 2006), evidenciando que diferentes parasitos podem afetar diferentemente a inflamação tecidual.

Os fatores imunes induzidos por células ativadas contribuem para a mudança de isotipo de anticorpos, onde o perfil de anticorpos produzidos está diretamente relacionado com a resposta imune induzida pela patógeno (INNES, 2007). Por isso, os camundongos foram infectados com *N. caninum* e foi verificado que não houve diferença na produção de IgG total entre os grupos de animais WT e *Gal3<sup>-/-</sup>*.

Em suma, os resultados demonstram que a falta de galectina-3 pode não interferir na resistência do hospedeiro contra *N. caninum*, seja por controle da replicação do parasito em experimentos de fase crônica, assim como o dano tecidual causado por processos inflamatórios

gerados pela infecção. Ademais, mais informações sobre sua função, sem dúvidas, pavimentará o caminho para a compreensão da infecção por *N. caninum*.

## **7. CONCLUSÃO**

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a ausência de galectina-3 induz uma menor perda de peso em camundongos infectados por *N. caninum*. Além disso, nosso trabalho também mostra que galectina-3 pode não estar relacionado com a resistência à infecção por *Neospora caninum*, seja na replicação parasitária, na inflamação tecidual ou na produção de anticorpos. Assim, concluímos que galectin-3, nos parâmetros analisados, não participa na resistência contra o parasito protozoário *N. caninum*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUADO-MARTÍNEZ, A. *et al.* Characterisation of NcGRA7 and NcSAG4 proteins: Immunolocalisation and their role in the host cell invasion by *Neospora caninum* tachyzoites. **Acta Parasitologica**, v. 55, p. 304–312, 2010. <https://doi.org/10.2478/s11686-010-0056-9>
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, p. 675–680, 2001. <https://doi.org/10.1038/90609>
- ALMERÍA, S. *et al.* Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 287–294, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00162-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00162-0)
- ALMERÍA, S.; SERRANO-PÉREZ, B.; LÓPEZ-GATIUS, F. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 177–182, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.042>
- ALVES, C. M. O. S. *et al.* Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 140, p. 210–219, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001473>
- ANDRIANARIVO, A. *et al.* Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 87, p. 817–825, 2001. <https://doi.org/10.1007/s004360100442>
- ARRANZ-SOLÍS, D. *et al.* Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent *Neospora caninum* Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model. **Veterinary Parasitology**, v. 211, p. 133–140, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.021>
- BARBER, J. S.; TREES, A. J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Vet Rec**, v. 139, p. 439–443, 1996. <https://doi.org/10.1136/vr.139.18.439>
- BARR, B. C. *et al.* Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **J Vet Diagn Invest**, v. 6, p. 207–215, 1994. <https://doi.org/10.1177/104063879400600212>
- BARTLEY, P. M. *et al.* Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v. 133, p. 421–432, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000539>
- BARTLEY, P. M. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in wild carnivorans in Great Britain. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 279–283, 18 fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.001>
- BERNARDES, E. S. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **American Journal of Pathology**, v. 168, p. 1910–1920, 2006. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050636>

- BINDER, E. M.; LAGAL, V.; KIM, K. The prodomain of *Toxoplasma gondii* GPI-anchored subtilase TgSUB1 mediates its targeting to micronemes. **Traffic**, v. 9, p. 1485–1496, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00774.x>
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 582-587, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.013>
- CARRUTHERS, V. B.; BLACKMAN, M. J. A new release on life: Emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 1617-1630, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04483.x>
- CHAIN, M. DE O. *et al.* Galectin-3 mediates survival and apoptosis pathways during *Trypanosoma cruzi*–host cell interplay. **Experimental Parasitology**, v. 216, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107932>
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology**, v. 65, p. 629–641, 2006a. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.003>
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 2491–2494, 2006b. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2491-2494.2006>
- COOPER, D. N. W. Galectinomics: finding themes in complexity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 209–231, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00310-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00310-0)
- DA SILVA, M. V. *et al.* Dectin-1 compromises innate responses and host resistance against *Neospora caninum* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00245>
- DARWICH, L. *et al.* Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 377–381, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.024>
- DAVOLI-FERREIRA, M. *et al.* Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep29289>
- DE MAREZ, T. *et al.* Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1647-1657, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00154-X)
- DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, p. 181-189, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>
- DONAHOE, S. L. *et al.* A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 216–238, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>

- DOS SANTOS MIRANDA, V. *et al.* Toll-like receptor 3–TRIF pathway activation by *Neospora caninum* RNA enhances infection control in mice. **Infection and Immunity**, v. 87, 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00739-18>
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean journal of parasitology**, v. 41, p. 1–16, 2003. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>
- DUBEY, J. P. *et al.* Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1157–1167, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.005>
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. **J Vet Diagn Invest**, v. 2, p. 230–233, 1990. <https://doi.org/10.1177/104063879000200316>
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 5–59, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7)
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90–108, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323–367, 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>
- EASTICK, F. A.; ELSHEIKHA, H. M. Stress-driven stage transformation of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1009–1014, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1788-z>
- FERREIRINHA, P. *et al.* Protective effect of intranasal immunization with *Neospora caninum* membrane antigens against murine neosporosis established through the gastrointestinal tract. **Immunology**, v. 141, p. 256–267, 2014. <https://doi.org/10.1111/imm.12191>
- GIBSON-CORLEY, K. N.; OLIVIER, A. K.; MEYERHOLZ, D. K. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. **Veterinary Pathology**, v. 50, p. 1007–1015, 2013. <https://doi.org/10.1177/0300985813485099>
- GONDIM, L. F. P. *et al.* Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 1361–1365, 2004. <https://doi.org/10.1645/GE-341R>
- GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 133–150, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>
- HE, J.; BAUM, L. G. Presentation of Galectin-1 by Extracellular Matrix Triggers T Cell Death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4705–4712, 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311183200>
- HEMPHILL, A. *et al.* Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 23–36, 2013. <https://doi.org/10.2741/E593>

- HEMPHILL, A.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; MÜLLER, J. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. **Parasitology**, v. 143, p. 245–259, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001596>
- HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.-I. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, p. 297-304, 1993. <https://doi.org/10.1093/glycob/3.4.297>
- HORCAJO, P. *et al.* Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. **Parasite Immunology**, v. 38, p. 709-723, 2016. <https://doi.org/10.1111/pim.12342>
- HOU, B. *et al.* Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 278–283, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011549108>
- INNES, E. A. *et al.* The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 29–36, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004>
- INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 134, p. 1903-1910, 2007. <https://doi.org/10.1017/S0031182007000194>
- JOHNSON II, D.; WIDLANSKI, T. Overview of the Synthesis of Nucleoside Phosphates and Polyphosphates. **Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry**, v. 13, 2003. <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1301s15>
- KHAN, I. A. *et al.* *Neospora caninum*: Role for immune cytokines in host immunity. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 24–34, 1997. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.4110>
- KING, J. S. *et al.* Extensive production of *Neospora caninum* tissue cysts in a carnivorous marsupial succumbing to experimental neosporosis. **Veterinary Research**, v. 42, 2011. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-75>
- LEFFLER, H. *et al.* Introduction to galectins. **Glycoconjugate**, v. 19, p. 433–440, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014072.34840.04>
- LEMBERGER, K. Y. *et al.* *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 960–961, 2005. <https://doi.org/10.1645/GE-407R.1>
- LIDDELL, S.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Vertical Transmission of *Neospora caninum* in BALB/c Mice Determined by Polymerase Chain Reaction Detection. **The Journal of Parasitology**, v. 85, p. 550–555, 1999. <https://doi.org/10.2307/3285794>
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 29-41, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrc1527>
- LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Fetal Loss in BALB/c Mice Infected with *Neospora caninum*. **The Journal of Parasitology**, v. 82, p. 608–611, 1996. <https://doi.org/10.2307/3283785>

- LUDWIG, I. S.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 408-413, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.03.009>
- MALEY, S. W. *et al.* Characterization of the Immune Response in the Placenta of Cattle Experimentally Infected with *Neospora caninum* in Early Gestation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 130–141, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.07.001>
- MANSILLA, F. C.; CAPOZZO, A. V. Apicomplexan profilins in vaccine development applied to bovine neosporosis. **Experimental Parasitology**, v. 183, p. 64-68, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.009>
- MARTINEZ, V. G. *et al.* Galectin-1, a cell adhesion modulator, induces apoptosis of rat Leydig cells in vitro. **Glycobiology**, v. 14, p. 127–137, 2004. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh025>
- MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V. *et al.* Transgenic *Neospora caninum* strains constitutively expressing the bradyzoite NcSAG4 protein proved to be safe and conferred significant levels of protection against vertical transmission when used as live vaccines in mice. **Vaccine**, v. 29, p. 7867–7874, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.091>
- MCALLISTER, M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 32, p. 443–463, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>
- MCALLISTER, M. M.; WALLACE, R. L.; BJORKMAN, C. A Probable Source of *Neospora caninum* Infection in an Abortion Outbreak in Dairy Cows. **Bovine Practitioner**, v. 39 2005. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol39no2p69-74>
- MINEO, T. W. P. *et al.* Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 149–153, 2009a. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.024>
- MINEO, T. W. P. *et al.* Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Research**, v. 40, 2009b. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009015>
- MINEO, T. W. P. *et al.* Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 825–833, 2010. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.52>
- MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: What can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v. 140, p. 52-70, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.015>
- MOTA, C. M. *et al.* *Neospora caninum* activates p38 MAPK as an evasion mechanism against innate immunity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01456>
- NISHIKAWA, Y. *et al.* In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 811–817, 2001. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.811-817.2001>

- NISHIKAWA, Y. Towards a preventive strategy for neosporosis: Challenges and future perspectives for vaccine development against infection with *Neospora caninum*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, p. 1374-1380, 2017. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0285>
- OAKLEY, M. S. *et al.* Pathogenic roles of CD14, galectin-3, and OX40 during experimental cerebral malaria in mice. **PLoS ONE**, v. 4, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006793>
- PATTERSON, R. J.; WANG, W.; WANG, J. L. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 499-506, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014079.87862.c7>
- PELLETIER, I. *et al.* Specific recognition of *Leishmania major* poly- $\beta$ -galactosyl epitopes by galectin-9: Possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 22223-22230, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302693200>
- PELLETIER, I.; SATO, S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 17663-17670, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201562200>
- PENA, H. F. J. *et al.* Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 61-66, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.002>
- PERILLO, N.; MARCUS, M.; BAUM, L. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of Molecular Medicine**, v. 76, p. 402-412, 1998. <https://doi.org/10.1007/s001090050232>
- QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: A cause of immunemediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 391-394, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02324-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02324-3)
- RABINOVICH, G. *et al.* Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends in Immunology**, v. 6, p. 313-320, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02232-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02232-9)
- RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. Turning “sweet” on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 338-352, 2009. <https://doi.org/10.1038/nri2536>
- REICHEL, M. P. *et al.* Control options for *Neospora caninum*-Is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, p. 1455-1470, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000158>
- RODRIGUES, A. A. R. *et al.* Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 139-150, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.007>
- RUBINSTEIN, N. *et al.* The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**, v. 64, p.1-12, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0001-2815.2004.00278.x>

- SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R. *et al.* Influence of dose and route of administration on the outcome of infection with the virulent *Neospora caninum* isolate Nc-Spain7 in pregnant sheep at mid-gestation. **Veterinary Research**, v. 49, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0539-5>
- SATO, S.; NIEMINEN, J. Seeing strangers or announcing “danger”: Galectin-3 in two models of innate immunity. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 583-591, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014089.17121.cc>
- SPENCER, J. A. *et al.* *Neospora caninum*: Adoptive transfer of immune lymphocytes precipitates disease in BALB/c mice. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, p. 329–333, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.04.001>
- TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconjugate Journal**. v. 19, p. 543-549, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014084.01324.15>
- TANAKA, T. *et al.* The role of CD4 + or CD8 + T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 183-191, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00238-7)
- TASUMI, S.; VASTA, G. R. A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus*. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 3086–3098, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3086>
- TEIXEIRA, L. *et al.* Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. **Immunology**, v. 116, p. 38–52, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02195.x>
- THAISS, C. A. *et al.* Integration of Innate Immune Signaling. **Trends in Immunology**, v. 37, p. 84-101, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.12.003>
- TOSCANO, M. A. *et al.* Endogenous galectin-3 controls experimental malaria in a species-specific manner. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 383–387, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01366.x>
- TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 558–561, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>
- VASTA, G.; AHMED, H. *Animal Lectins: A Functional View* (1<sup>st</sup> ed.) **CRC Press**. <https://doi.org/10.1201/9781420006971>
- VASTA, G.; AHMED, H. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: An unresolved paradox. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00199>
- VASTA, G. R. *et al.* C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 401-420, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00020-8)
- VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 424-438, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2146>

- VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 391-412, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>
- VONLAUFEN, N. *et al.* In Vitro Induction of *Neospora caninum* Bradyzoites in Vero Cells Reveals Differential Antigen Expression, Localization, and Host-Cell Recognition of Tachyzoites and Bradyzoites. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 576–583, 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.576-583.2004>
- WALLIS, R. Structural and Functional Aspects of Complement Activation by Mannose-binding Protein. **Immunobiology**, v. 205, p. 433–445, 2002. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00144>
- WANG, X. *et al.* NLRP3 Inflammasome Participates in Host Response to *Neospora caninum* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01791>
- WEIS, W. I. *et al.* The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunological Reviews**, v. 163, p. 19–34, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01185.x>
- WILLIAMS, D. J. L. *et al.* *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: The time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v. 121, p. 347–358, 2000. <https://doi.org/10.1017/S0031182099006587>
- YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: Structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, 2008. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>

## 9. ANEXO

Anexo 1: Comprovante de aprovação do Comitê de Ética e Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia.



### CERTIFICADO

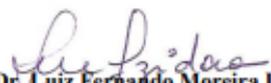
Certificamos que o projeto intitulado “Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica”, protocolo nº 109/16, sob a responsabilidade de **Tiago Wilson Patriarca Mineo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **01 de Novembro de 2021**.

(We certify that the project entitled “Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica”, protocol 109/16, under the responsibility of **Tiago Wilson Patriarca Mineo** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of November 01th, 2021).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2016 Término: 31/12/2022
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico e camundongo <i>Knockout</i>
Número de animais	4572
Peso / Idade	20 g / 6-8
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	REBIR - UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

**Alteração Realizada:** Alteração na data término de 31/12/2021 para 31/12/2022.

Uberlândia, 01 de novembro de 2021.

  
**Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Comissão de Ética na Utilização de Animais  
Coordenador da CEUA  
Portaria R Nº 1114/2020