

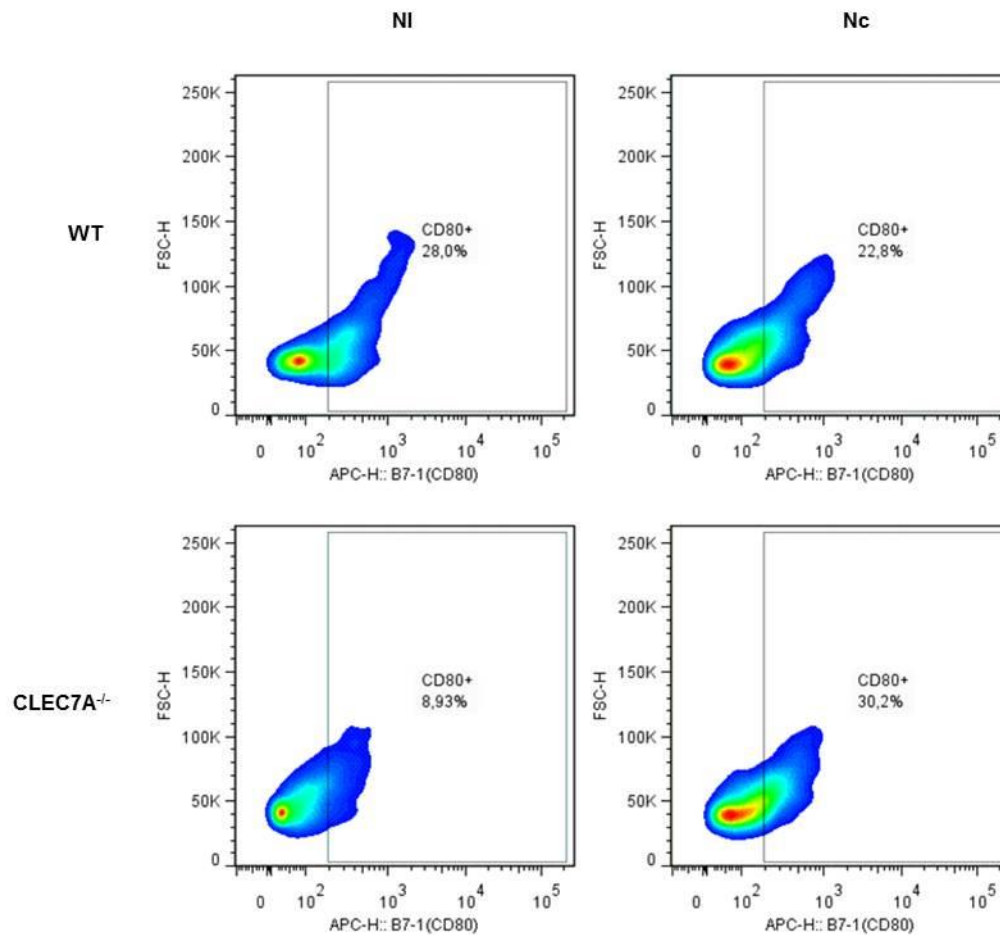


Figura 7: Expressão da molécula co-estimuladora (CD80) em macrófagos incubados com taquizoítos de *N. caninum*. BMDMs selvagens (WT) e CLEC7A nocaute (CLEC7A^{-/-}) foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI:1) e a expressão de CD80 foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados na forma de gráficos “Pseudocolor” de uma amostra representativa de três experimentos independentes.

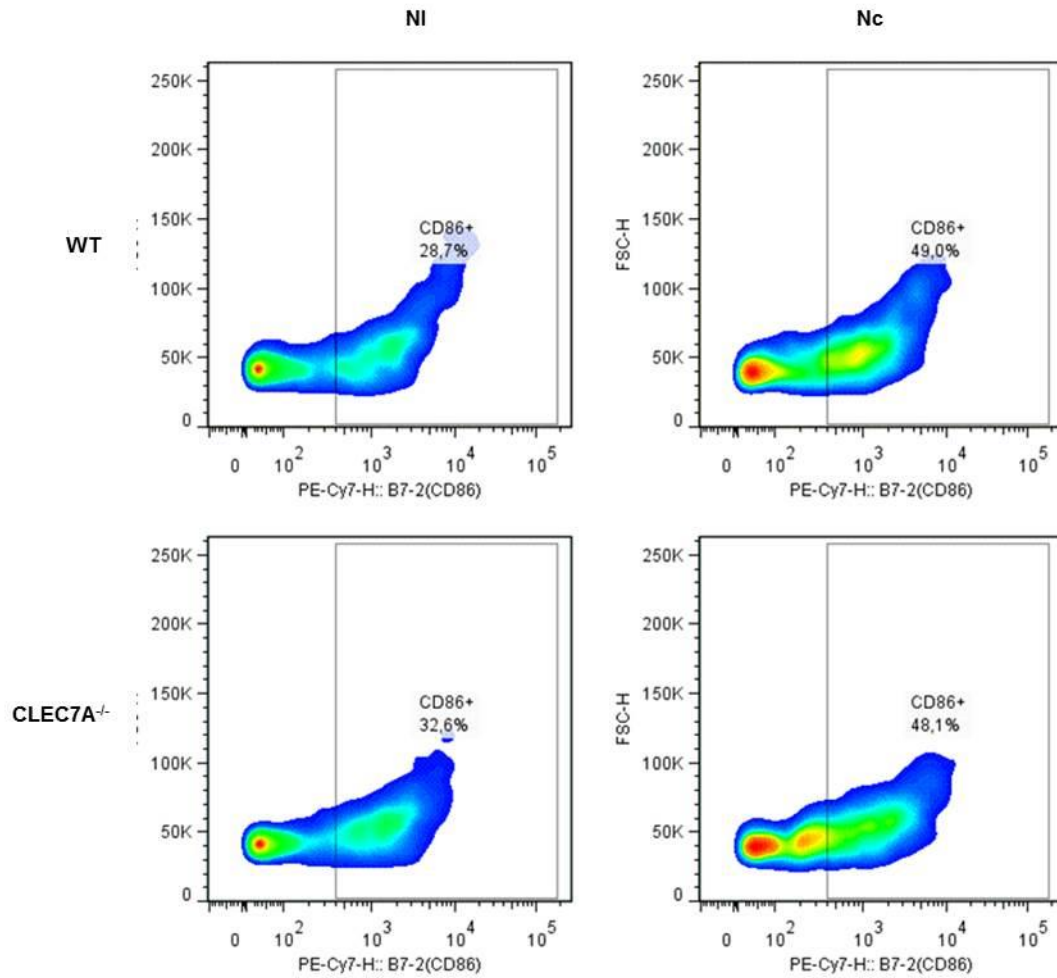


Figura 8: Expressão da molécula co-estimuladora (CD86) em macrófagos incubados com taquizoítos de *N. caninum*. BMDMs selvagens (WT) e CLEC7A nocaute (CLEC7A^{-/-}) foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI:1) e a expressão de CD80 foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados na forma de gráficos “Pseudocolor” de uma amostra representativa de três experimentos independentes.

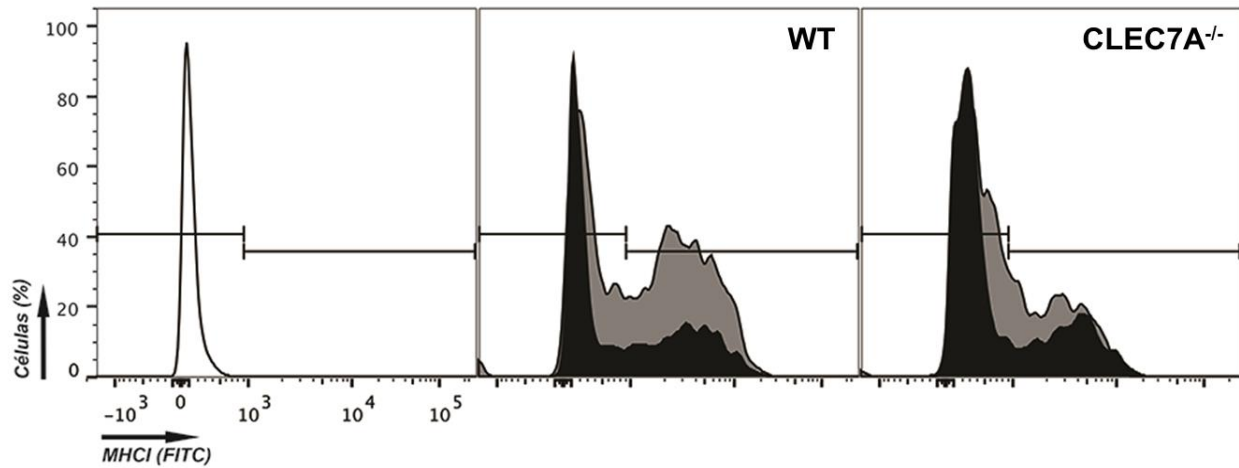


Figura 9: Expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHCII) em macrófagos incubados com taquizoítos de *N. caninum*. BMDMs selvagens (WT) e CLEC7A nocaute (CLEC7A^{-/-}) foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI:1) e a expressão de MHCII foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados na forma de gráficos “Pseudocolor” de uma amostra representativa de três experimentos independentes.

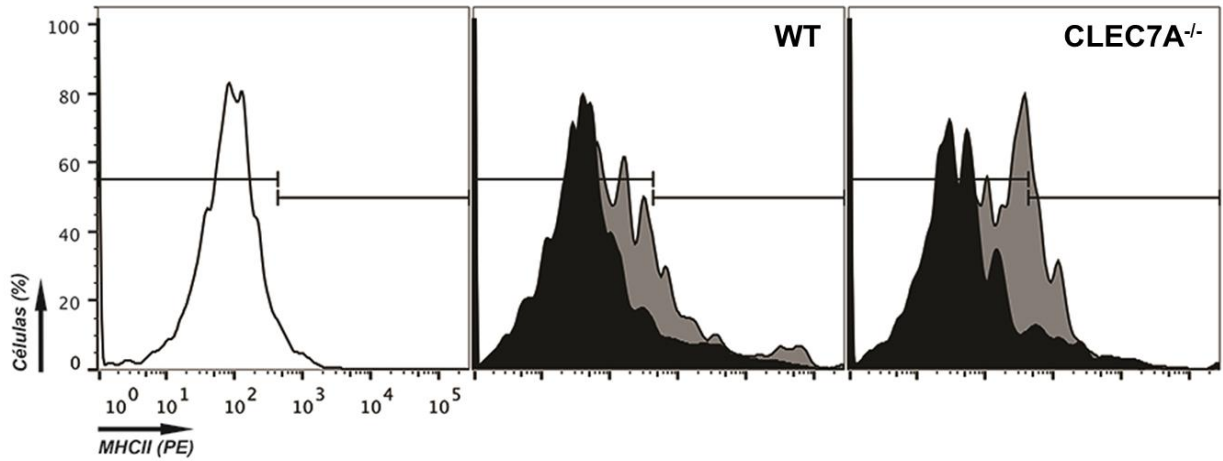


Figura 10: Expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHCII) em macrófagos incubados com taquizoítos de *N. caninum*. BMDMs selvagens (WT) e CLEC7A nocaute (CLEC7A^{-/-}) foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI:1) e a expressão de MHCII foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados na forma de gráficos “Pseudocolor” de uma amostra representativa de três experimentos independentes.

5.1.4 Parasitismo *in vitro*

Com objetivo de avaliar o parasitismo celular *in vitro*, BMDMs WT e CLEC7A^{-/-} foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* marcados com DDAO. O parasitismo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da quantificação da marcação dos taquizoítos por DDAO. Os resultados apresentam que macrófagos CLEC7A^{-/-} são menos parasitados que macrófagos WT, demonstrando uma menor susceptibilidade de macrófagos deficientes em reconhecimento de glicanos na infecção por *N. caninum* (Figura 11).

5.1.5 Parasitismo *in vivo*

Após observar uma maior produção da citocina pró-inflamatória IL-12p40 na fase aguda da infecção por *N. caninum* em camundongos CLEC7A^{-/-} e também por BMDMs e BMDCs CLEC7A^{-/-}, o parasitismo agudo e crônico foi avaliado. Para tal, camundongos WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose não letal de taquizoítos de *N. caninum* marcados com CFSE. Após três dias de infecção o lavado peritoneal foi realizado e células duplo positivas: CD11b⁺/CFSE⁺ foram quantificadas. Observou-se então que macrófagos peritoneais de camundongos CLEC7A^{-/-} apresentam menor parasitismo agudo, uma vez que a porcentagem de células CFSE⁺ apresentou-se reduzida neste grupo (Figura 12). Outro lote de animais foi separado em grupos de animais infectados ou não com taquizoítos de *N. caninum* não marcados e acompanhados diariamente por trinta dias. Após este período os animais foram eutanasiados e a quantificação da carga parasitária foi avaliada pelo método de PCR em tecido cerebral. Semelhante aos dados obtidos em relação ao parasitismo agudo, camundongos CLEC7A^{-/-} apresentam carga parasitária significativamente menor na fase crônica da infecção (Figura 13).

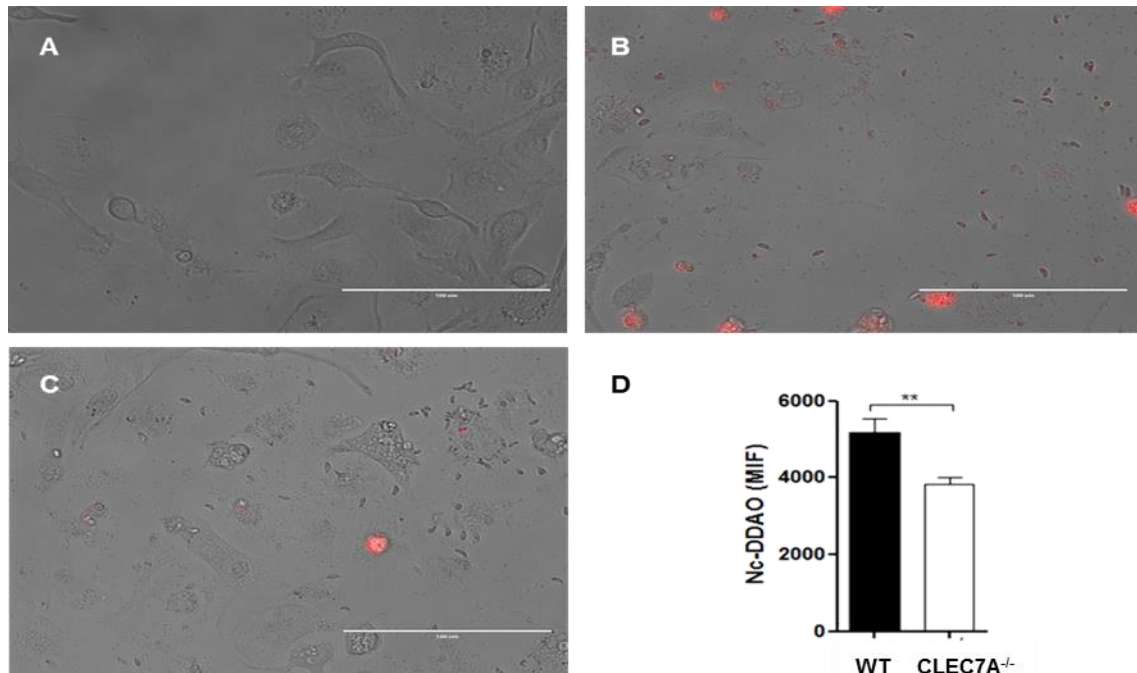


Figura 11: Parasitismo *in vitro* em macrófagos WT e CLEC7A^{-/-}. BMDMs selvagens (WT) e CLEC7A nocaute (CLEC7A^{-/-}) foram incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI:1) marcados com DDAO. (A-C) são fotomicrografias ilustrativas, em que (A) apresenta macrófagos não infectados, (B) macrófagos WT, apresentando maior quantidade de células infectadas – marcação em vermelho, (C) macrófagos CLEC7A^{-/-} com menor marcação – menor parasitismo. Em (D) observa-se dados adquiridos de ensaio de citometria de fluxo, onde se tem uma menor intensidade média de fluorescência (menor quantidade de parasitos) em macrófagos CLEC7A^{-/-}. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD. ** indica relevância estatística em que $p < 0.01$.

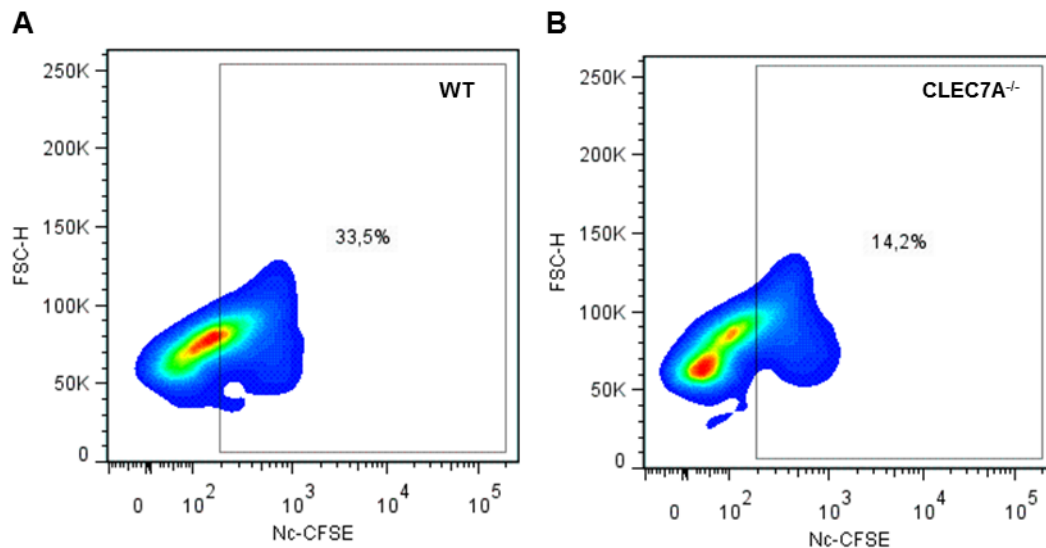


Figura 12: Parasitismo agudo em macrófagos peritoneais. Camundongos C57BL/6 WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose não letal de taquizoítos viáveis de *N. canium* marcados com CFSE. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal e a quantificação das células duplo positivas (CD11b+/CFSE+) por citometria de fluxo. Em (A) observa-se macrófagos de animais WT com uma maior porcentagem de células CFSE+. (B) apresenta macrófagos de animais CLEC7A^{-/-} com menor porcentagem de células infectadas. Os resultados são apresentados na forma de gráficos “Pseudocolor” de uma amostra representativa de três experimentos independentes.

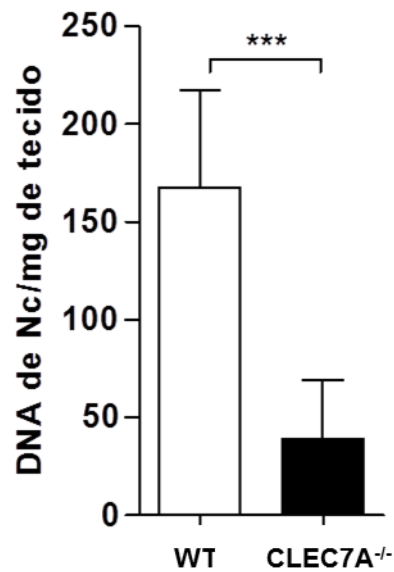


Figura 13: Parasitismo crônico em camundongos CLEC7A^{-/-}. Camundongos C57BL/6 WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose não letal de taquizoítos viáveis de *N. canium*. Após trinta dias de infecção os animais foram eutanasiados e a carga parasitária quantificada por PCR. Observa-se que animais CLEC7A^{-/-} apresentam menor parasitismo cerebral. Os resultados foram apresentados em média ± SD. *** indica relevância estatística em que $p < 0.001$.

5.1.6 Sobrevida

Uma vez observado que o receptor CLEC7A apresenta papel importante na resposta imune inata frente à infecção por *N. caninum*, onde células CLEC7A^{-/-} apresenta maior produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, TNF- α e IL-1 β), maior expressão de moléculas importantes nas sinapses imunológicas como CD80 e MHCII; e que animais CLEC7A^{-/-} apresenta maior produção de IL-12p40, menor parasitismo agudo e crônico. O próximo passo foi avaliar a susceptibilidade de animais CLEC7A^{-/-} frente à infecção por *N. caninum*. Para isso, camundongos WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose letal de taquizoítos de *N. caninum* e acompanhados por trinta dias. Foi observado que animais CLEC7A^{-/-} apresentam maior sobrevida que WT, demonstrando que a via de reconhecimento de CLEC7A está envolvida na patogênese da infecção por *N. caninum* (Figure 14).

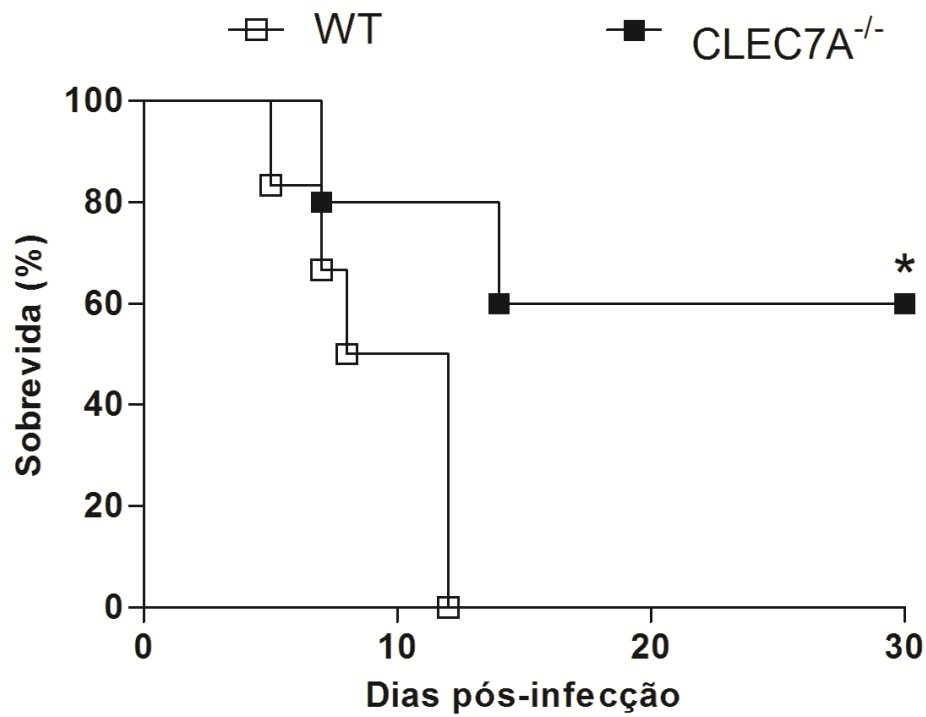


Figura 14: Camundongos CLEC7A^{-/-} apresentam maior sobrevivência frente à infecção por *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com dose letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum* e acompanhados diariamente durante trinta dias. Resultado representativo de três experimentos independentes.* indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

5.2 CLEC7A como um alvo para o desenvolvimento de medidas terapêuticas na infecção por *Neospora caninum*

Como observado nos resultados acima apresentados, onde CLEC7A apresenta função modulatória da resposta imune frente a *N. caninum*, o uso de um bloqueador de CLEC7A (Laminarina) como possível agente terapêutico na infecção por este protozoário foi avaliado.

5.2.1 O tratamento com Laminarina induz maior produção de IL-12p40 e espécies reativas de oxigênio (ROS) na infecção aguda por *N. caninum*

Objetivando avaliar o papel de Laminarina na produção de IL-12p40, ROS e NO em ensaios *in vivo*, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem foram tratados ou não com Laminarina por sete dias e infectados no terceiro dia de tratamento. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal para a quantificação da produção de IL-12p40 pelo método ELISA no fluido do lavado peritoneal, e a quantificação da produção de ROS e NO através da incubação de células advindas do lavado peritoneal com as sondas DHCF-2DA e DAF-2DA, respectivamente. Os resultados apresentaram que animais tratados com Laminarina apresentam maior produção de IL-12p40 no peritônio (Figura 15), similarmente ao observado em animais CLEC7A^{-/-} (Figura 6A). Em relação à produção de ROS, foi verificado que animais tratados com Laminarina apresentam maior porcentagem de células produtoras desta molécula (Figura 16A) e maior intensidade de produção de ROS por células do peritônio (Figura 16B). Entretanto, outra molécula efetora também descrita como importante no controle das infecções por protozoários, o óxido nítrico – NO, não apresentou diferenças em relação à porcentagem de células produtoras de NO (Figura 16C), nem em relação à intensidade de produção desta molécula pelas células analisadas (Figura 16D).

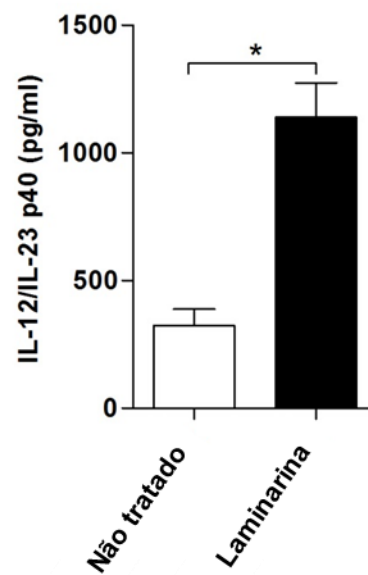


Figura 15: O tratamento com Laminarina aumenta a produção de IL-12p40 durante a fase aguda da infecção por *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com laminarina e infectados com dose não letal de taquizoítos de *N. caninum*. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal e a quantificação de IL-12p40 por ELISA. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD. * indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

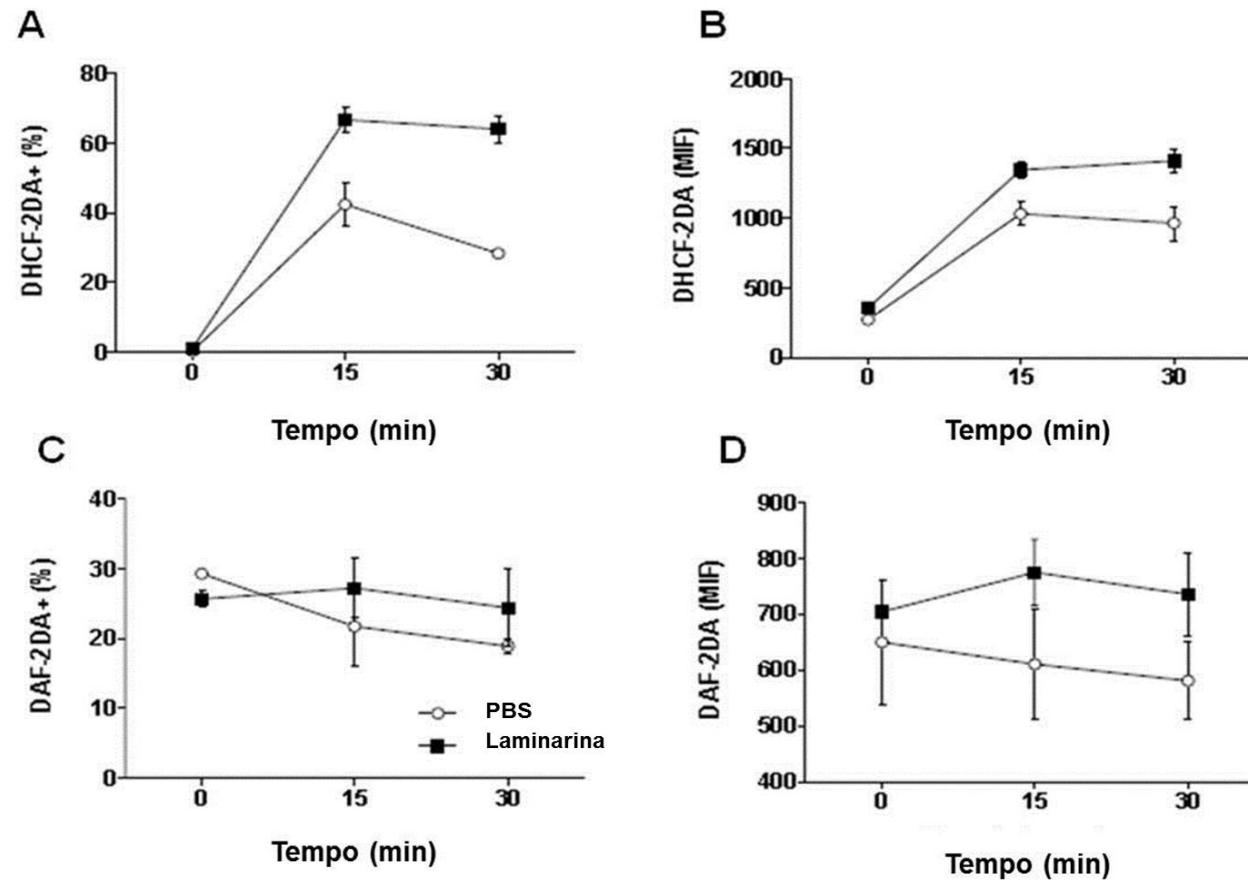


Figura 16: O tratamento com Laminarina aumenta a produção de ROS em células do lavado peritoneal de camundongos na fase aguda da infecção por *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com Laminarina e infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum*. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal e a quantificação da produção de ROS e NO por citometria de fluxo. Em (A) observa-se porcentagem de células produtoras de ROS e em (B) observa-se intensidade de produção de ROS por células de animais tratados com Laminarina. Em (C) porcentagem e em (D) intensidade de produção de NO por células peritoneais não difere quando tratado ou não com Laminarina.

5.2.2 O tratamento de macrófagos com Laminarina reduz o parasitismo

Com o objetivo de avaliar a influencia de Laminarina no parasitismo celular *in vitro*, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com Laminarina por 3 horas e incubados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* por mais 24 horas, posteriormente as células foram fixadas com formaldeído 3%, e coradas com Azul de Toluidina. O parasitismo celular foi determinado por avaliação de dois microscopistas independentes. Foi observado que macrófagos tratados com Laminarina apresentam menor quantidade de taquizoítos em seu citoplasma, refletindo uma menor susceptibilidade destas células à infecção por *N. caninum* (Figura 17).

5.2.3 CLEC7A modula a produção de ROS, uma molécula importante no controle da infecção por *N. caninum*

Objetivando avaliar o papel de ROS durante a infecção por *N. caninum*, camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e NOX2 nocaute (NOX2^{-/-}) – deficientes na produção de ROS - foram infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* marcados com CFSE (*N. caninum*-CFSE+) e o parasitismo agudo avaliado após três dias infecção pela quantificação de células peritoneais CFSE positivas através de citometria de fluxo. Foi observado que animais NOX2^{-/-} apresentam maior parasitismo, demonstrando a importância de ROS no controle da infecção (Figura 18). Como o tratamento com Laminarina induz maior produção de ROS no peritônio de camundongos, o próximo passo foi avaliar se CLEC7A está realmente envolvido na modulação da produção de ROS em animais não tratados com Laminarina. Assim, camundongos WT e NOX2^{-/-} foram tratados com Laminarina e infectados com taquizoítos de *N. caninum*-CFSE+. As análises de citometria de fluxo apresentaram uma redução no parasitismo de camundongos WT tratados com Laminarina (Figura 19A e 19B), o que não é observado em animais NOX2^{-/-} (Figuras 19C e 19D), demonstrando que CLEC7A está relacionado com a modulação da produção de ROS em células do peritônio de camundongos na fase aguda da infecção por *N. caninum*.

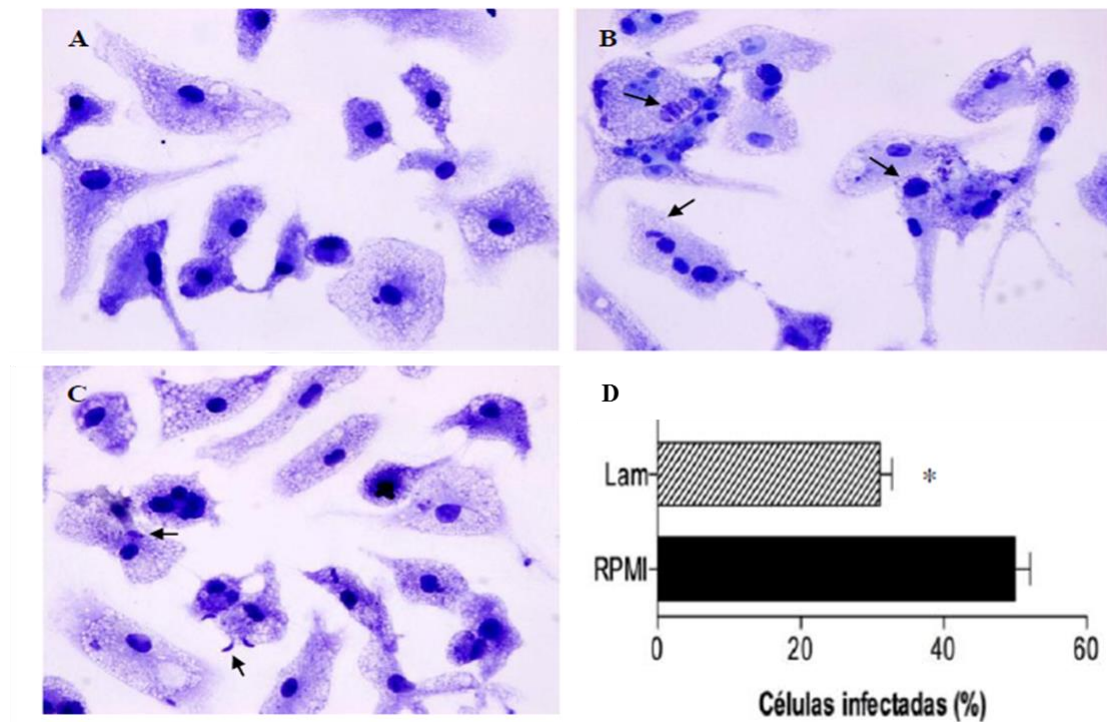


Figura 17: O tratamento com laminarina reduz o parasitismo *in vitro*. (A-C) Fotomicrografias representativas de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (BMDMs), incubados por 24 horas com taquizoítos viáveis de *N. caninum* (MOI 3). (A) macrófagos não infectados, (B) macrófagos não tratados com Laminarina, as setas apontam células contendo grande número de parasitos no citoplasma, (C) macrófagos tratados com laminarina (1000 µg/ml) apresentam quantidade reduzida de taquizoítos intracelulares. Em (D) gráfico demonstrativo da redução do parasitismo em macrófagos tratados com laminarina. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD. * indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

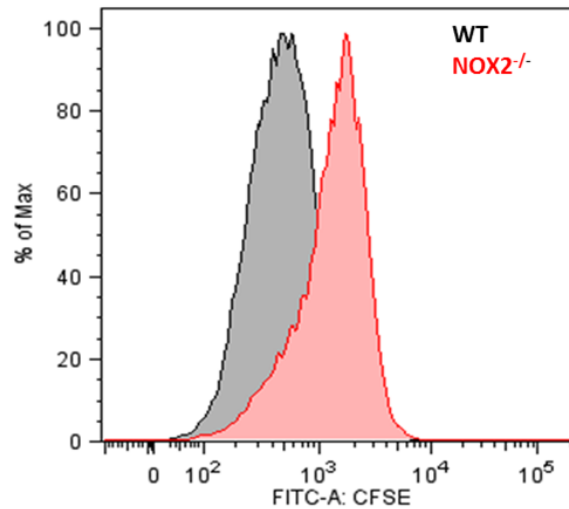


Figura 18: A produção de espécies reativas de oxigênio é crucial para o controle do parasitismo na infecção por *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e geneticamente deficientes de NOX2 (NOX2^{-/-}) foram infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* marcados com CFSE. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal e a quantificação de células CFSE+. Observa-se que animais NOX2^{-/-}, que apresentam ausência da principal via de indução de ROS, apresentam maior parasitismo agudo. Os dados foram expressos na forma de histograma representativo de dois experimentos independentes.

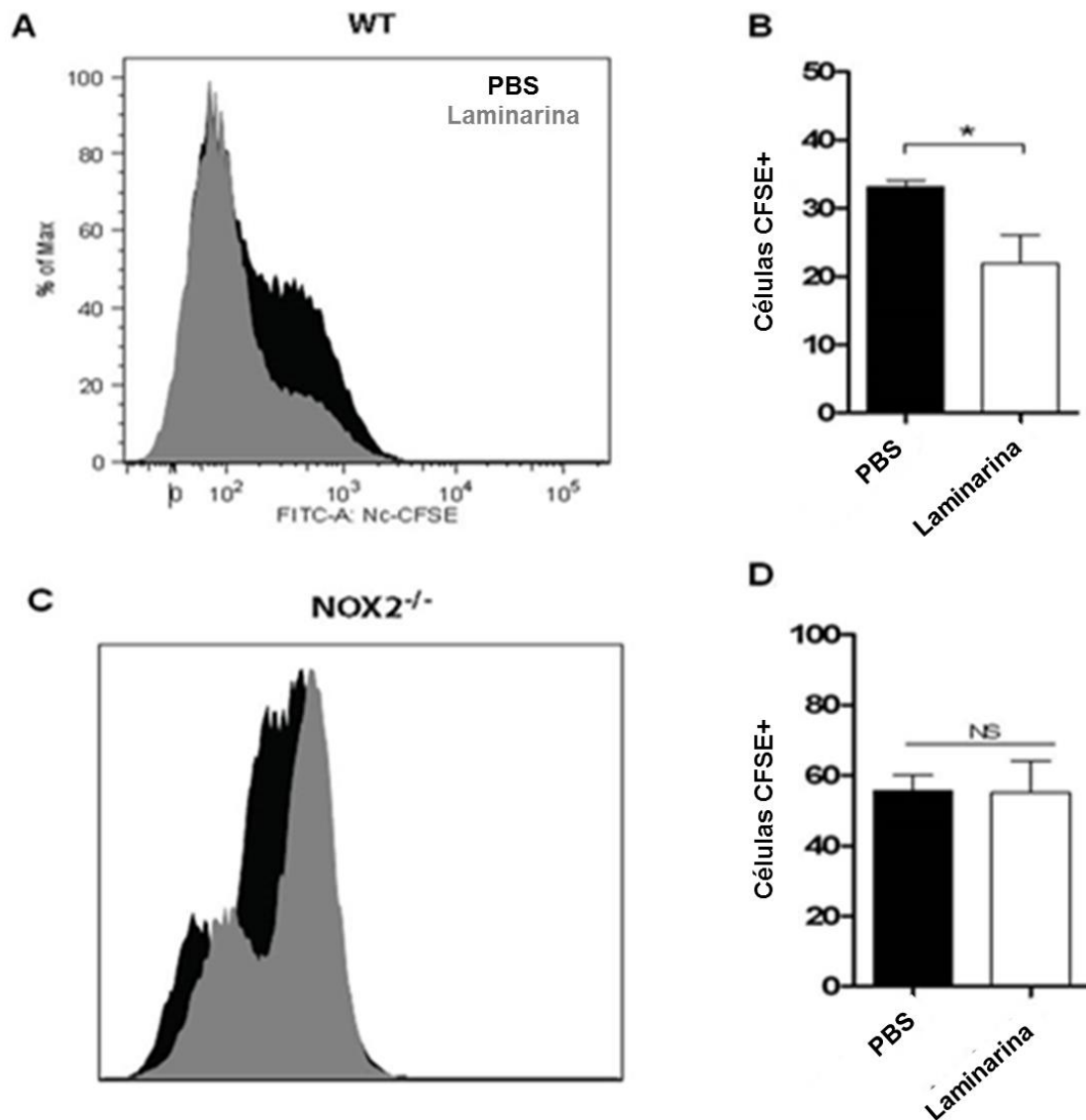


Figura 19: *Neospora caninum* modula a produção de espécies reativas de oxigênio por meio de CLEC7A favorecendo sua proliferação. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes na produção de ROS (NOX2^{-/-}) foram tratados ou não com laminarina e infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* marcados com CFSE. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal e a quantificação de células CFSE+. (A) histograma representativo e (B) gráfico demonstrando parasitismo em animais WT tratados com Laminarina. (C) histograma representativo e (D) gráfico demonstrando o parasitismo em células peritoneais de camundongos NOX2^{-/-}. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD. * indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

5.2.4 Parasitismo e Inflamação *in vivo* após tratamento com Laminarina

Visto que o tratamento com Laminarina induz maior produção de IL-12p40 e maior produção de ROS no peritônio de camundongos infectados com *N. caninum*, a influência da administração de Laminarina no parasitismo agudo foi então avaliado. Para tal, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem foram tratados ou não com Laminarina e infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum*-CFSE+. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal seguido pela análise das células obtidas por citometria de fluxo. Os resultados revelam que animais tratados com Laminarina apresentam menor parasitismo agudo (Figura 20A e B), de forma semelhante aos dados obtidos com animais CLEC7A^{-/-} (Figura 12). Uma vez observado a redução no parasitismo agudo em animais tratados com Laminarina, a análise do parasitismo e inflamação crônicos em tecido cerebral foram realizados por PCR e técnica histológica de H&E, respectivamente. Os resultados apresentaram que a redução no parasitismo agudo observado anteriormente refletiu em uma menor carga parasitária na fase crônica da infecção por *N. caninum*, visto que animais tratados com Laminarina apresentam quantidades ínfimas de DNA do parasito no cérebro, quando comparado com animais não tratados (Figura 21A). Como consequência de uma reduzida carga parasitária no cérebro, observou-se uma redução significativa da inflamação cerebral (Figura 21B).

5.2.5 Produção de anticorpos específicos anti-*Neospora caninum* em camundongos tratados ou não com Laminarina

Objetivando avaliar a influência da administração de Laminarina na produção de anticorpos específicos anti-*N. caninum*, camundongos C57BL/6 WT foram tratados ou não com Laminarina durante sete dias e infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* no quarto dia de tratamento. Amostras de soro foram coletadas a cada dez dias após a infecção, e a produção de IgG total e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) foram avaliadas por ELISA. Os resultados apresentam que existe uma predominância da subclasse IgG1 durante a infecção por este protozoário em todos os grupos. No entanto, animais tratados com Laminarina apresentam menor produção de IgG1 (Figura 22), culminado em uma maior relação IgG2a/IgG1, característico das respostas imunes com predominância de um padrão Th1, crítico no controle da infecção por protozoários intracelulares.

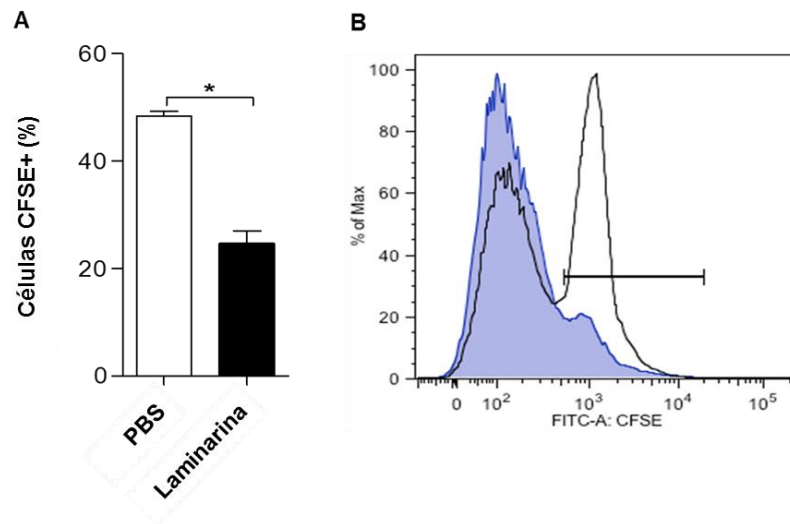


Figura 20: O tratamento com Laminarina reduz o parasitismo agudo por *Neospora caninum*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com Laminarina e infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* marcados com CFSE. Após três dias de infecção foi realizado o lavado peritoneal e a quantificação de células CFSE+. (A) Parasitismo peritoneal de camundongos tratados ou não com Laminarina (B) histograma representativo do parasitismo em camundongos tratados com Laminarina (Azul) e não tratados (Branco). Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD. * indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

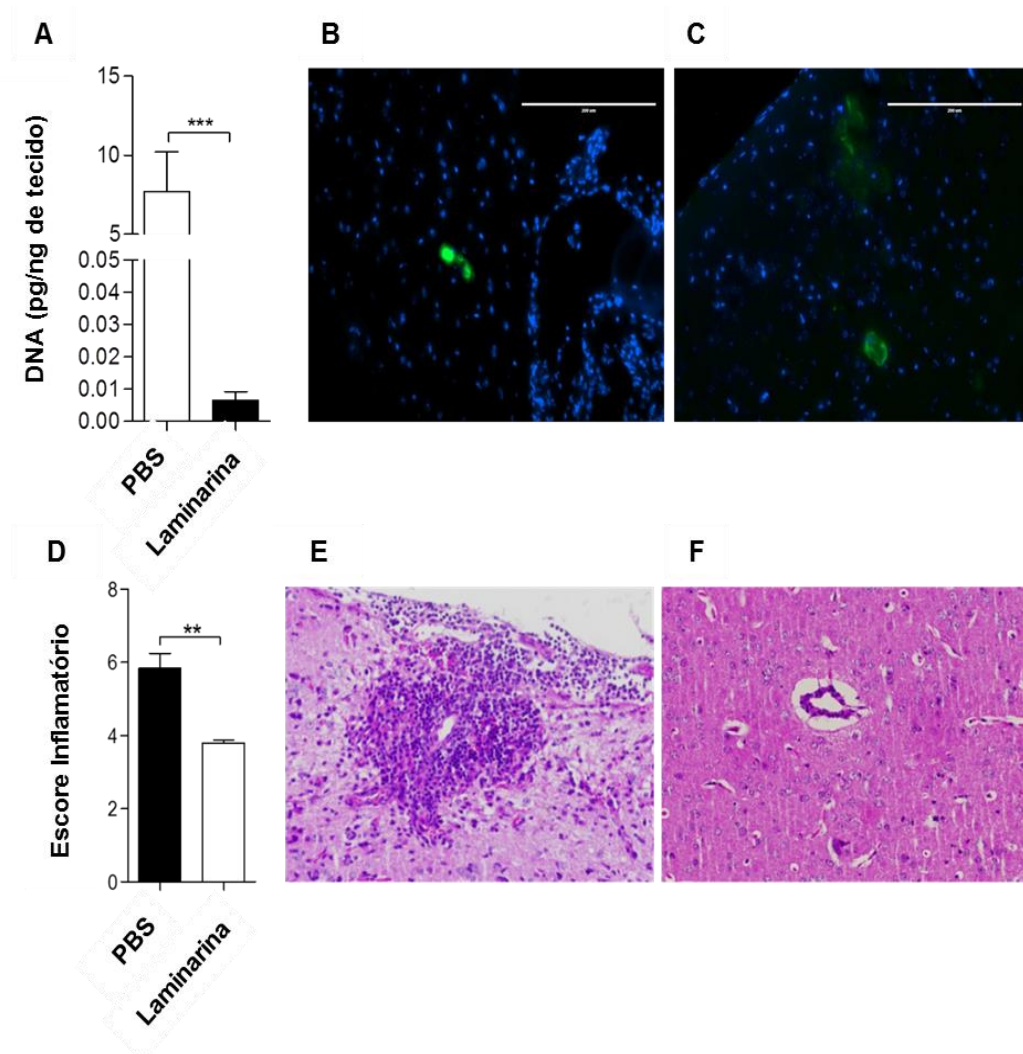


Figura 21: O tratamento com Laminarina reduz o parasitismo crônico e inflamação cerebral por *Neospora caninum*. Camundongos C57BL/6 tratados ou não com Laminarina e infectados com taquizoítos viáveis de *N. caninum* foram acompanhados durante 30 dias. (A) animais tratados com Laminarina apresentam redução na carga parasitária cerebral. (B) Fotomicrografia ilustrativa do cérebro de animal tratado com Laminarina e em (C) de camundongo não tratado. (D) Escore inflamatório de animais tratados ou não com Laminarina. (E) Fotomicrografia ilustrativa de foco inflamatório de cérebro de animal não tratado e (F) Tratado com Laminarina. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD. * indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

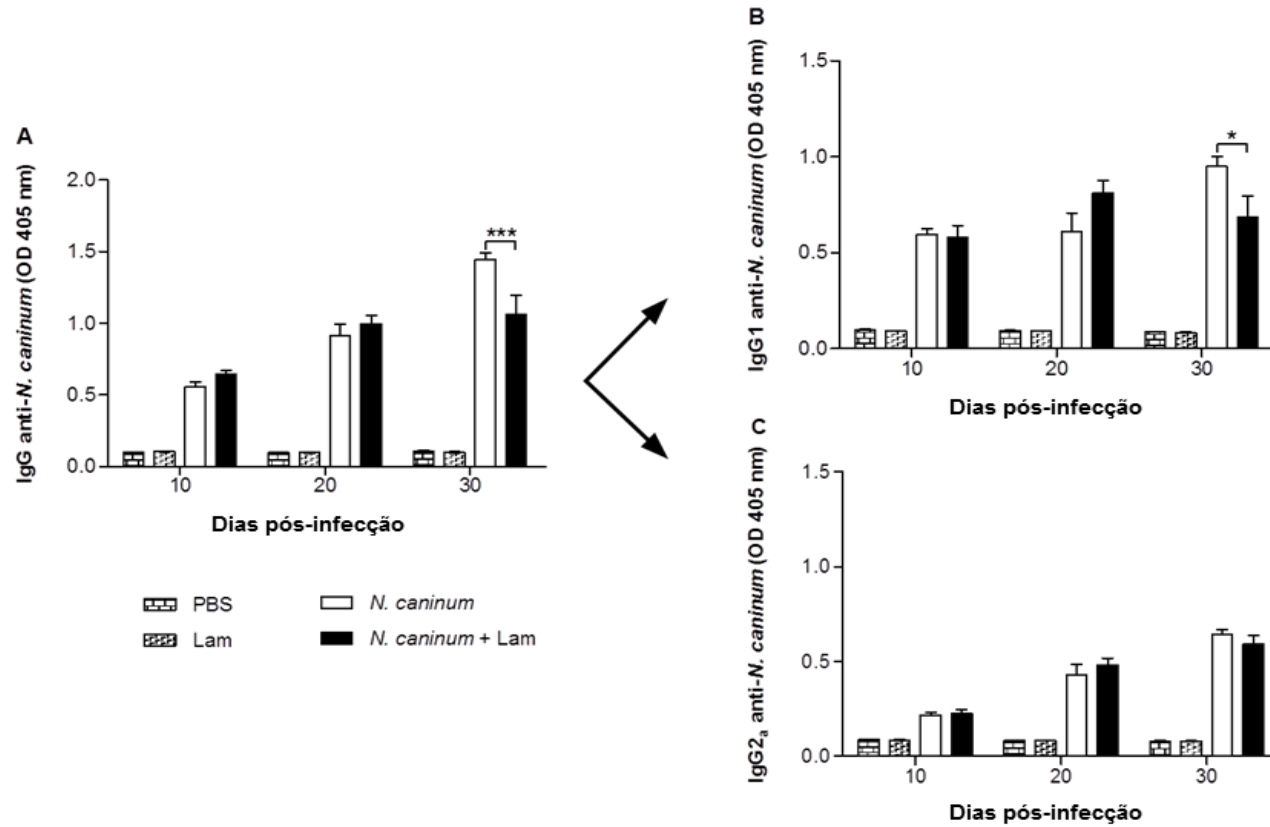


Figura 22: O tratamento com Laminarina reduz a produção de anticorpos IgG1 durante a infecção por *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com Laminarina e infectados com dose não letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum*. Amostras de soro foram obtidas nos dias 10, 20 e 30 pós-infecção para quantificação da produção de (A) IgG total, (B) IgG1 e (C) IgG2a por ELISA. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD. * indica relevância estatística em que $p < 0.05$, e *** $p < 0.001$.

5.2.6 O tratamento com Laminarina aumenta a sobrevida de camundongos infectados com *N. caninum*

Como demonstrado em nossos resultados, o tratamento com Laminarina induz um aumento de citocinas pró-inflamatórias, assim como um aumento na produção da molécula efetora ROS e consecutivamente uma diminuição do parasitismo celular e tecidual. Assim, nós procuramos elucidar se realmente o tratamento com Laminarina induz proteção em camundongos infectados com *N. caninum*. Para isso, camundongos C57BL/6 foram tratados por sete dias com Laminarina e inoculados no quarto dia de tratamento com uma dose letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum*. Os animais foram acompanhados diariamente por trinta dias para análise da curva de sobrevida. Os resultados apresentam que o tratamento com Laminarina resgata 50% dos animais desafiados com dose letal de *N. caninum* (Figura 23A). Adicionalmente, camundongos sobreviventes deixaram de apresentar sintomas clínicos e voltaram a ganhar peso corporal (Figura 23B).

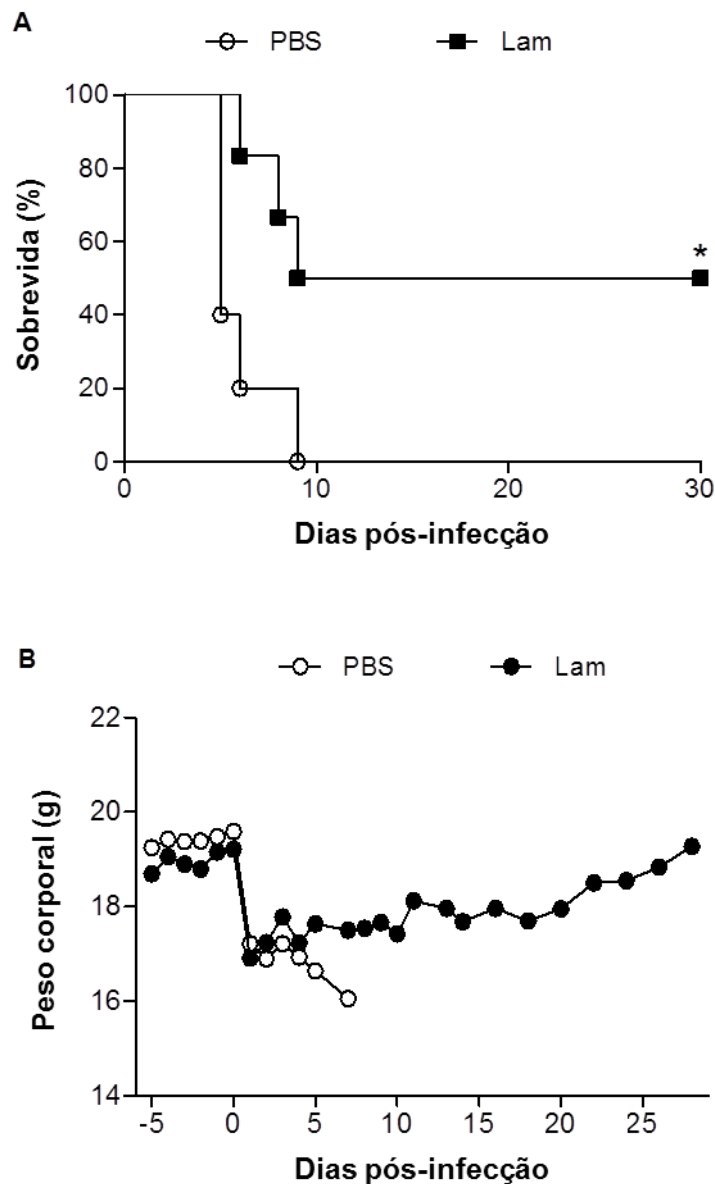


Figura 23: Camundongos tratados com Laminarina apresentam maior sobrevivência frente à infecção por *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 selvagens foram tratados ou não com laminarina e infectados com dose letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum*. Diariamente, durante trinta dias os animais foram acompanhados quanto à sobrevivência e peso corporal. Observa-se que o tratamento com laminarina resgata 50% dos animais desafiados (A) e que os animais sobreviventes voltam a ganhar peso corporal normalmente (B). Resultado representativo de três experimentos independentes. *indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

5.3 CLEC7A como um alvo para o desenvolvimento de medidas profiláticas na infecção por *Neospora caninum*

5.3.1 Produção de anticorpos anti-*Neospora caninum* por camundongos imunizados com NLA associado ou não a Laminarina

Com intuito de avaliar a capacidade adjuvante de Laminarina, camundongos C57BL/6 selvagens foram imunizados com três doses de NLA ou NLA associado à Laminarina com intervalo de 21 dias entre cada dose. Durante este período os animais foram acompanhados sorologicamente por ELISA. Foi verificado que a imunização com a associação (Laminarina + NLA) não induz diferenças em relação à quantidade de anticorpos da classe IgG (Figura 24). Contudo, animais imunizados com NLA associado à Laminarina apresentam a capacidade de reconhecer maior quantidade de frações antigênicas, especialmente as de alto peso molecular, fato este não observado em animais imunizados apenas com NLA (Figura 25).

5.3.2 A imunização com NLA associado à Laminarina resgata animais da infecção por *N. caninum*

Como animais imunizados com a associação entre NLA e Laminarina apresentam melhor capacidade de reconhecimento antigênico. O potencial de proteção desta imunização foi testado através do desafio de animais imunizados com NLA+Laminarina ou somente NLA com dose letal de *N. caninum*. Foi observado que a associação entre NLA+Laminarina resgata 33% dos camundongos desafiados (Figura 26) mostrando proteção moderada conferida pela simples administração de Laminarina em conjunto com NLA.

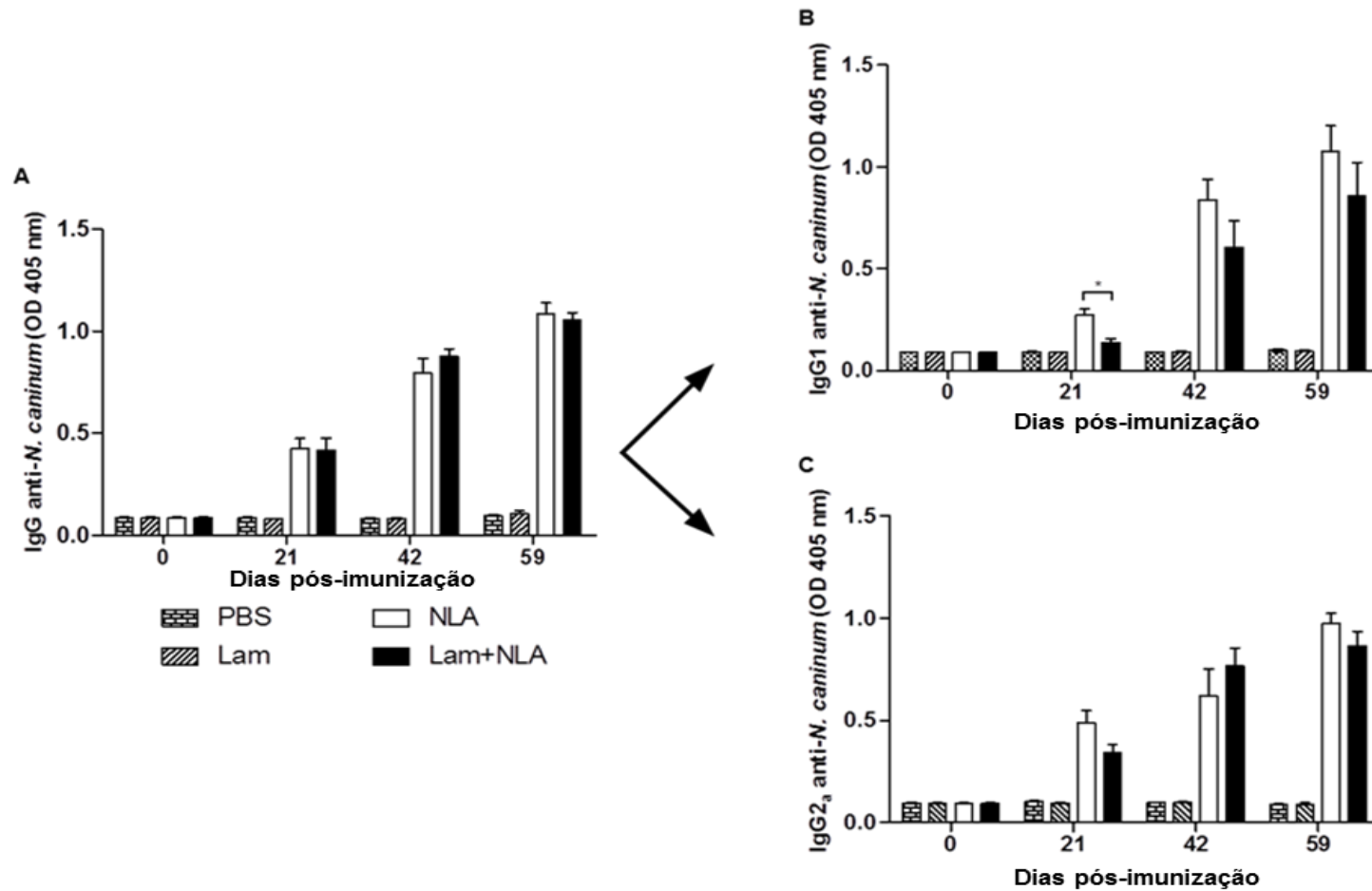


Figura 24: A associação de Laminarina com antígeno lisado de *N. caninum* (NLA) em protocolo de imunização não influencia na produção de anticorpos da classe IgG. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com três doses de PBS, Lam, NLA ou Lam+NLA, com intervalo de 21 dias entre cada imunização. Amostras sanguíneas foram coletadas nos dias 0, 21, 42 e 59 após a primeira imunização para detecção da produção de (A) IgG total, (B) IgG1 e (C) IgG2a por ELISA. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ SD.

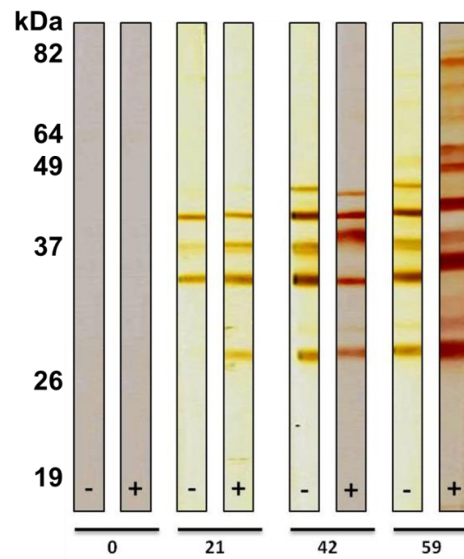


Figura 25: A associação entre Laminarina e antígenos lisados de *N. caninum* (NLA) em protocolo de imunização aumenta a capacidade de reconhecimento antigênico por anticorpos da classe IgG. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com três doses de PBS, Lam, NLA ou Lam+NLA, com intervalo de 21 dias entre cada imunização. Amostras de soro foram obtidas nos dias 0, 21, 42 e 59 após a primeira imunização para análise do perfil de reconhecimento antigênico. Immunoblotting ilustrativo de amostras obtidas de um animal de cada grupo (NLA ou NLA+Lam). (-) Camundongo imunizado apenas com NLA e (+) Camundongo imunizado com NLA associado à Laminarina.

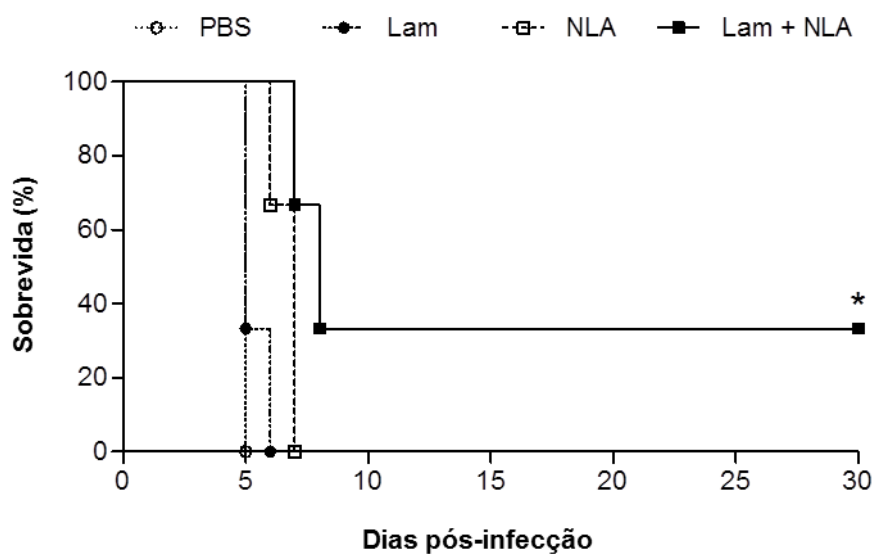


Figura 26: A imunização com antígenos lisados de *N. caninum* (NLA) associado à Laminarina aumenta a sobrevivência de camundongos desafiados com *N. caninum*. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com três doses de PBS, Lam, NLA ou Lam+NLA, com intervalo de 21 dias entre cada imunização. Quinze dias após a última imunização os animais foram desafiados com dose letal de taquizoítos viáveis de *N. caninum* e acompanhados diariamente por trinta dias. Observa-se que a associação entre NLA e Laminarina resgata 33% dos animais desafiados. *indica relevância estatística em que $p < 0.05$.

6. DISCUSSÃO

O receptor CLEC7A é expresso principalmente por células de origem mielóides como: macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. No entanto, sua expressão foi também identificada em linfócitos B e T, sendo que nestas células de origem linfoide este receptor aparentemente não apresenta funções definidas (WILLMENT et al., 2005). O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel deste receptor na resposta imune frente à infecção por *N. caninum*. Assim o primeiro passo foi avaliar a expressão deste receptor em diferentes tipos celulares durante a infecção por este protozoário. Foi verificado que células dendríticas, macrófagos, células *Natural Killer* e Polimorfonucleares apresentam maior expressão deste receptor em animais *naïve*, sendo estes resultados concordantes com os dados já descritos na literatura. Curiosamente, foi observado que durante a infecção por *N. caninum* o perfil de expressão de CLEC7A nos diferentes tipos celulares é alterado, sendo que células dendríticas passam a expressar maior quantidade de CLEC7A em sua superfície, diferentemente dos demais tipos celulares. Já macrófagos, de forma geral, apresentam uma redução na expressão deste receptor, apenas uma pequena porcentagem da população destas células apresentam aumento na expressão de CLEC7A. Assim, estes dados nos levam a inferir que CLEC7A pode ter papel importante na resposta imune contra *N. caninum*.

Como macrófagos e células dendríticas são os principais tipos celulares que sofrem alterações na expressão de CLEC7A durante a infecção por *N. caninum*, a produção de citocinas por estes dois tipos celulares foi avaliado. Observou-se que macrófagos e células dendríticas apresentam perfil de produção de citocinas semelhante, sendo que células dendríticas produziram maiores concentrações de todas as citocinas, conforme esperado. A presença de CLEC7A em ambas as células apresenta a função de modular para uma menor produção de todas as citocinas avaliadas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40 e TNF α), uma vez que macrófagos e células dendríticas CLEC7A^{-/-} apresentam maiores concentrações destas citocinas.

O papel deste receptor na ativação celular e indução de produção de citocinas têm sido avaliado na infecção por diferentes patógenos e tem apresentado padrões diferenciados para cada um. Devido ao seu caráter de reconhecer glicanos, CLEC7A é muito estudado nas infecções causadas por fungos, principalmente *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e também nas infecções causadas por micobactérias como *Mycobacterium*

tuberculosis, por serem microrganismos com estrutura rica em glicídios (SAIJO et al., 2007; WERNER et al., 2009).

Estudos que demonstrem a importância deste receptor na resposta imune frente a protozoários ainda são pouco executados. Recentemente, Lefèvre e colaboradores (2013) demonstraram que CLEC7A é crucial na resposta imune de macrófagos contra *Leishmania infantum*. Macrófagos CLEC7A^{-/-} apresentam menor produção de IL-1 β , ROS, e maior carga parasitária sanguínea e no baço. Mas a produção de IL-12p40, IL-6, TNF α e IL-10 não foi avaliada. Os resultados com *N. caninum* aqui apresentados são discordantes do estudo com *L. infantum*, onde macrófagos e células dendríticas CLEC7A^{-/-} infectados com *N. caninum* apresentam maior produção de IL-1 β , assim como maior produção de IL-12p40, IL-6, TNF- α e também IL-10.

A produção de IL-6 e TNF- α foram avaliadas em outro estudo durante a infecção de macrófagos peritoneais e células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6 com formas do fungo *Coccidioides immitis*. Foi verificado que estas células quando deficientes em CLEC7A produzem menores concentrações de IL-6 e TNF- α . Contudo, quando camundongos WT e CLEC7A^{-/-} foram infectados com *Coccidioides immitis*, e a produção de citocinas foi avaliada em células do lavado broncoalveolar após 14 dias de infecção, observou-se que a produção de IL-6 e TNF- α foi maior em células CLEC7A^{-/-} (VIRIYAKOSOL et al., 2013). Perfil semelhante ao observado neste estudo, onde macrófagos e células dendríticas CLEC7A^{-/-}, quando infectados com *N. caninum*, apresentam maior produção destas duas citocinas.

As citocinas IL-12p40 e IL-10 são citocinas chave na resposta imune frente a diferentes patógenos. Um estudo recente mostra que a produção de IL-12p40 durante a infecção de células esplênicas por *Mycobacterium tuberculosis* é prejudicada na ausência de CLEC7A, demonstrando que este receptor participa da indução desta citocina pró-inflamatória durante a resposta por esta bactéria (ROTHFUCHS et al., 2010). Diferentemente do observado na infecção por *M. tuberculosis* a produção de IL-12p40 é maior na ausência de CLEC7A durante a infecção por *N. caninum* em macrófagos e células dendríticas. Dados semelhantes foram observados quando se avaliou o papel de CLEC7A na indução de IL-10 por Zymosan (agonista de CLEC7A) em macrófagos derivados de medula óssea. Observou-se que a ausência de CLEC7A culmina com a redução de IL-10 (ELCOMBE et al., 2013),

diferindo também dos dados aqui apresentados quando macrófagos e células dendríticas foram expostos à taquizoítos viáveis de *N. caninum*.

Visto as diferenças evidentes em relação à participação de CLEC7A na indução da produção de diferentes citocinas por patógenos distintos. Estudos vêm apresentando que dentro de uma mesma espécie de microrganismo, diferentes cepas são capazes de induzir distintos padrões de resposta imune via CLEC7A. Este fato fica evidente em um estudo comparativo entre capacidade de duas cepas de *Candida albicans* na ativação da resposta imune via CLEC7A. Observou-se que CLEC7A não foi envolvido na imunidade (produção de citocinas, carga parasitária e resistência à infecção) contra a cepa ATCC18804 de *C. albicans*. Em contraste, este receptor é crítico para a indução de todos os parâmetros acima citados para no controle da infecção pela cepa SC5314 de *C. albicans* (MARAKALALA et al., 2013), o que pode em parte explicar as diferenças entre os padrões de resposta induzidos por *N. caninum* via CLEC7A e diferentes patógenos já bem caracterizados na literatura como *C. albicans*.

Durante a infecção por *N. caninum* foi observado que além da maior produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, TNF- α , IL-1 β), células CLEC7A^{-/-} apresentam maior expressão de moléculas importantes no processo de apresentação de antígenos (CD80, MHCII), além de apresentarem menor carga parasitária, sugerindo o papel imunomodulatório de CLEC7A. Para melhor estudar este papel imunomodulatório de CLEC7A, ensaios *in vivo* foram realizados. Inicialmente verificou-se a produção de IL-12p40 em animais WT e CLEC7A^{-/-}. Semelhante ao observado *in vitro*, animais CLEC7A^{-/-} apresentam maior produção desta citocina pró-inflamatória, além de menor parasitismo agudo e crônico, sendo mais resistentes à infecção por *N. caninum*. Estes dados confirmam que CLEC7A apresenta atividade modulatória da resposta imune durante a infecção por *N. caninum*.

As diferenças observadas no padrão de resposta imune induzida por CLEC7A contra diferentes patógenos pode ser devidamente explicadas pelas variações sutis no padrão molecular associado aos diferentes gêneros e até mesmo cepas de microrganismos (MARAKALALA et al., 2013). Contudo, as características da espécie hospedeira também podem influenciar de forma significativa na resposta imune via CLEC7A, uma vez que estudos tem apresentado que diferentes espécies de camundongos apresentam expressões diferentes deste receptor, mostrando que o background do hospedeiro influencia resposta imune (CARVALHO et al., 2012; NETEA et al., 2010; HEINSBROEK et

al., 2006; WHILEY et al., 2012), podendo ser estas possíveis explicações para os resultados contraditórios em relação ao papel de CLEC7A encontrados na literatura e os dados aqui apresentados.

Uma vez observado por nós que a ausência de CLEC7A garante proteção durante a infecção por *N. caninum*, e que a literatura, há décadas, mostra a atividade imunoestimulatória dos glicanos (CANNAS et al., 2003). Aqui nós avaliamos o potencial imunoestimulatório do β -glucano laminarina, um bloqueador específico de CLEC7A, durante a infecção por *N. caninum*. Nossos resultados apresentam que a incubação de macrófagos com Laminarina e posterior incubação com taquizoítos de *N. caninum* reduz o parasitismo celular. Adicionalmente, a administração terapêutica do bloqueador reduz a carga parasitária na cavidade peritoneal de camundongos na fase inicial da infecção, bem como no cérebro na fase crônica, sugerindo que o β -glicanolaminarina é efetivo na indução da contenção da replicação do parasito. Resultados similares foram reportados por (MURAMATSU et al., 2012) com a administração oral de glicanos obtido de sobrenadante de cultura da levedura *Aureobasidium pullulans*, em modelo de infecção pelo vírus da influenza A fim de determinar se Laminarina apresenta efeitos citotóxicos diretos, experimentos *in vitro* em monocamadas de células hospedeiras e parasitos extracelulares, foram realizados utilizando concentrações semelhantes a dos experimentos *in vivo*. Não foi observada alteração na viabilidade celular em ambos os ensaios, confirmando que o efeito de Laminarina observado *in vivo*, é devido à modulação de respostas imunológicas e não efeito de citotoxicidade (dados não mostrados).

Tendo verificado a reduzida carga parasitária nos cérebros de animais tratados com Laminarina, a análise histológica por H&E foi realizada para determinar a inflamação. Observou-se uma redução acentuada da inflamação cerebral nos animais tratados, o que reflete a carga parasitária reduzida neste grupo. Resultados semelhantes foram também observados em modelo de infecção por *N. caninum* (MANSILLA et al., 2011) usando uma lectina extraída de soja (*Glycine max*), onde o β -glucano foi utilizado como adjuvante associado à extrato de taquizoítos de *N. caninum* e foi capaz de reduzir patologias cerebrais como encefalite multifocal supurativa, manguito perivascular e meningoencefalite não supurativa após a infecção dos animais imunizados com *N. caninum*.

A avaliação da cinética de produção de anticorpos da classe IgG específicos anti-*N. caninum* apresenta um a predominância de IgG1 em todos os grupos e em todos os tempos analisados. Diferenças foram observadas entre os grupos somente após trinta dias de infecção,

quando nós observamos a redução desta subclasse no grupo tratado com laminarina. Esta redução pode ser sugestiva de uma tendência da resposta imune para um perfil Th1, no qual se tem uma predominância de anticorpos da subclasse IgG2a.

Adicionalmente, para avaliar se Laminarina possui potencial adjuvante em protocolos de imunização contra *N. caninum*, o β -glucano foi associado a antígenos solúveis de *N. caninum* e administrado repetitivamente em camundongos, os quais foram monitorados quanto à produção de anticorpos e perfil de reconhecimento antigênico, bem como o efeito protetor desta imunização quando os animais imunizados ou não foram desafiados com dose letal de taquizoítos de *N. caninum*. Embora a administração de Laminarina em conjunto com NLA não promoveu diferenças significativas nos níveis de IgG e suas subclasses após a imunização, o β -glucano reforçou a capacidade de reconhecimento antigênico de camundongos imunizados com a associação entre Lam + NLA, os quais produziram anticorpos IgG específicos contra uma maior diversidade de frações antigênicas do parasito após o término do protocolo de imunização. Após o término do protocolo de imunização, observou-se que o mesmo resgata 33% dos animais desafiados com dose letal de taquizoítos. Embora estes dados sugere que o uso de Laminarina juntamente com antígenos parasitários gera proteção parcial em protocolos de imunização, fica claro que um padrão de proteção similar pode ser observado pela simples administração do β -glucano durante a infecção ativa por este protozoário. Possivelmente, a geração de novas formas de administração do β -glucano, como a conjugação (XIE et al., 2009) com proteínas imunogênicas de *N. caninum*, pode proporcionar maior eficácia aos protocolos de imunização.

De forma geral, os resultados apresentados neste estudo demonstram que CLEC7A está envolvido no mecanismo imunomodulatório que *N. caninum* induz sobre o hospedeiro e que Laminarina induz proteção parcial contra a infecção por *N. caninum*, quando administrada em infecções ativas ou como um componente na formulação de vacinas.

7. CONCLUSÕES

- A infecção por *N. caninum* altera a expressão de CLEC7A em células do sistema imune inato de camundongos;
- O receptor CLEC7A apresenta papel regulatório na produção das citocinas in vitro e in vivo;
- CLEC7A está envolvido em fenômenos de coestimulação e apresentação antigênica durante a infecção por *N. caninum*;
- A presença do receptor CLEC7A eleva o parasitismo agudo e crônico durante a infecção por *N. caninum*, reduzindo por consequência a sobrevivência de animais infectados;
- A administração de Laminarina, um bloqueador do receptor CLEC7A, induz parâmetros imunológicos semelhantes aos observados em camundongos geneticamente deficientes;
- Laminarina apresenta potencial terapêutico contra a infecção por *N. caninum*, uma vez que a administração do mesmo a camundongos resgata 50% dos animais desafiados com dose letal;
- Laminarina apresenta potencial adjuvante em protocolos de imunização, melhorando o perfil de reconhecimento antigênico e gerando modesta proteção em animais imunizadosdesafiados com *N. caninum*;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 162-70, 2005.

ALIBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection Immunity**, v. 64, p. 1961-1967, 1996.

ALMERÍA, S., SERRANO, B., YANIS, J. L., DARWICH, L., LÓPEZ-GATIUS, F. Cytokine gene expression. Profiles in peripheral blood mononuclear cells from *Neospora caninum* naturally infected dams throughout gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 237-243, 2012.

AMMANN, P.; WALDVOGEL, A.; BREYER, I.; ESPÓSITO, M.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B. The role of B- and T-cell immunity in toltrazuril-treated C57BL/6 WT, microMT and nude mice experimentally infected with *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 93, n. 3, p. 178–187, 2004.

ANDERSON, M. L., REYNOLDS, J. P., ROWE, J. D., SVERLOW, K. W., PACKHAM, A. E., BARR, B. C., CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 1169–1172, 1997.

ANTONY, A.; WILLIAMSON, N. B. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from rural and urban origin in central New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, n. 5, p. 232-237, 2003.

ARIIZUMI, K.; GUO-LIANG, S.; SHIKANO, S.; XU, S.; RITTER III, R.; KUMAMOTO, T.; EDELBAUM, D.; MORITA, A.; BERGSTRESSER, P. R.; TAKASHIMA, A. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **Journal Biological Chemistry**, v. 275, p. 20157–20167, 2000.

BARLING, K. S.; McNEILL, J. W.; THOMPSON, J. A.; PASCHAL, J. C.; McCOLLUM III, T.; CRAIG, T. M.; ADAMS, G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 9, p. 1356-1360, 2000.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W.; TARANTAL, A. F.; HENDRICKX, A. G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the non human primate. **Laboratory Investigation**, v. 71, p. 236-242, 1994.

BASSO, W.; VENTURINI, M. C.; BACIGALUPE, D.; KIENASTE, M.; UNZAGA, J. M.; LARSEN, A.; MACHUCA, M.; VENTURINI, L. Confirmed clinical *Neospora caninum* infections in a boxer puppy from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.299-303, 2005.

BASZLER, T. V., KNOWLES, D. P., DUBEY, J. P., GAY, J. M., MATHISON, B. A. MCELWAIN, T. F. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p.1423–1428, 1996.

BENEVIDES, L., CARDOSO, C. R., MILANEZI, C. M., CASTRO-FILICE, L. S., BARENCO, P. V. C., SOUSA, R. O., RODRIGUES, R. M., MINEO, J. R., SILVA, J. S., SILVA, N. M. *Toxoplasma gondii* Soluble Tachyzoite Antigen Triggers protective mechanisms against fatal intestinal pathology in oral infection of C57BL/6 Mice. **Plos one**, v.8: e75-138, 2013.

BI, L., GOJESTANI, S, WU. W., HSU YM. S., ZHU J., ARIIZUMI, K., LIN, X. CARD9 mediates dectin-2-induced I κ B α kinase ubiquitination leading to activation of NF- κ B in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*. **Journal Biological Chemistry**,v. 285, p.25969–77, 2010.

BIRON, C. A., GAZZINELLI, R. T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Current Opinion Immunology**,v. 7, p. 485-496, 1995.

BJERKAS, I., MOHN, S. F., PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and miositis in dogs. **ZeitschriftfürParasitenkund**,v. 70, p. 271-241, 1984.

BJÖRKMAN, C., MCALLISTER, M. M., FRÖSSLING, J., NASLUND, K., LEUNG, F., UGGLA, A. Application of the *Neospora caninum*IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. **JournalVeterinaryDiagnosticInvestigation**, v. 15, p. 3–7, 2003.

BRASIL GOVERNO FEDERAL. **Economia**. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/setores-da-economia> >. Acessoem: 04 abr. 2011.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.

BUXTON, D., MALEY, S. W., WRIGHT, S. E., RODGER, S., BARTLEY, P., INNES, E. *A.Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 25-28, 2007.

CANNAS, A., NAGULESWARAN, A., MÜLLER, N., EPERON, S., GOTTSTEIN, B., HEMPHILL, A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**, v. 126, p. 303-312, 2003.

CARDOSO, M. R. D., MOTA, C. M., RIBEIRO, D. P., SANTIAGO, F. M., CARVALHO, J. V., ARAUJO, E. C., SILVA, N. M., MINEO, T. W. P., ROQUE-BARREIRA, M. C., MINEO, J. R., SILVA, D. A. O. ArtinM, a D-mannosebinding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. **Vaccine**, v. 29, p. 9183-9193, 2011.

CARVALHO, G. L. X. DE; MOREIRA, L. E.; PENA, J. L.; MARINHO, C. C.; BAHIA, M. T.; MACHADO-COELHO, G. L. L. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraescopologic methods for the detection of human parasitosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p.80-84, 2012.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; BLANGBURN, B. L.; SORJONRN, D. C.; DUBEY, J. P. Vertical transmission of *Neospora* in dogs. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 208-211, 1995.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., LÓPEZ-PÉREZ, I., ÁLVAREZ-GARCÍA, G., ORTEGA-MORA, L. M. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 2491–2494, 2006.

CONRAD, P. A., BARR, B. C., SVERLOW, K. W., ANDERSON, M., DAFT, B., DUBEY, J. P., MUNSON, L., ARDANS, A. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine foetuses. **Parasitology**, v.106, p.239-249, 1993.

CZOP, J. K., AUSTEN, K. F. A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. **Journal Immunology**, v.134, p. 2588–2593, 1985.

DEBACHE, K., KROPF, C., SHUTZ, C. A., HARWOOD, L. J., KAUPER, P., MONNEY, T., ROSSI, N., LAUE, C., McCULLOUGH, K. C., HEMPHIL, A. Vaccination of mice with chitosan nanogel-associated recombinant NcPDI against challenge infection with *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 81-94, 2011.

DUBEY, J. P. Review of *N.caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p.1-16, 2003.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.57-72, 2004.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S. Neosporosis. **Parasitology Today**, v. 9, p. 452-458, 1993.

DUBEY, J. P., SCHARES, G. Neosporosis in animals—The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p.90-108, 2011.

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.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1-59, 1996.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; ANDERSON, M. L.; DAVIS, S. W.; SHEN, S. K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 709-713, 1992.

ELCOMBE, S. E., NAQVI, S., VAN DEN BOSCH, M. W. M., MACKENZIE, K. F., CIANFANELLI, F., BROWN, G.D., ARTHUR, J. S. C. Dectin-1 Regulates IL-10 Production via a MSK1/2 and CREB Dependent Pathway and Promotes the Induction of Regulatory Macrophage Markers. **Plos One**, v. 8, p. 1-15, 2013.

FERNANDES, B. C. T. M., GENNARI, S. M., SOUZA, S. L. P., CARVALHO, J. M., OLIVEIRA, W. G., CURY, M. C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlandia, Minas Gerais - Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p.33–40, 2004.

FERREIRA-JÚNIOR, A.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACEDO-JUNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA-FILHO, H. H.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P. Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. **Plos One**, v. 7, n.7, p. e40391, 2012.

GAO, Y. X., YANG, S., ZHOU, X. J., ZHANG, J. I., ZHANG, H. Preparation and characterization of sulfated tamarind polysaccharide. **Science and Technology of Food Industry**, v. 32, p.142–143, 2011.

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v.201, p. 9–25, 2004.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 2533–2543, 1994.

GEIJTENBEEK, T. B., GRINGHUIS, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p.465–79, 2009.

GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMPLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 159-161, 2004.

GOODRIDGE, H. S., REYES, C. N., BECKER, C. A., KATSUMOTO, T. R., MA, J., WOLF, A. J., BOSE, N., CHAN, A. S. H., MAGEE, A. S., DANIELSON, M. E., WEISS, A., VASILAKOS, J. P., UNDERHILL, D. U. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. **Nature**, v. 472, p 471-476, 2011.

GOODRIDGE, H. S., SIMMONS, R. M., UNDERHILL, D. M. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. **Journal Immunology**, v. 178, p.3107–15, 2007.

GOODRIDGE, H. S., WOLF, A. J., UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, v. 230, p. 38-50, 2009.

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.

GRINGHUIS, S. I., DEN DUNNEN, J., LITJENS, M., VAN DER VLIST, M., WEVERS, B., BRUIJINS, S. C., GEIJTENBEEK, T. B. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk.

Nature Immunology, v. 10, p.203–13, 2009.

HALL, C. A., REICHEL, M. P., ELLIS, J. T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary.Parasitology**, v.128, p. 231–241, 2005.

HEINSBROEK, S. E., TAYLOR, P. R., ROSAS, M., WILLMENT, J. A., WILLIAMS, D. L., GORDON, S., BROWN, G. D. Expression of functionally different Dectin-1 isoforms by murine macrophages.**Journal Immunology**,v.176, p.5513–5518, 2006.

HEMPHILL, A., VONLAUFEN, N., NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*.**Parasitology**, v. 133, p. 261–278, 2006.

HOWE, D. K. & SIBLEY, L. D. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.**International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1489 -1496, 1999.

INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 497-504, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Séries Históricas e Estatísticas**. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publ_completa.pdf>. Acessoem: 30 Nov. 2013.

LASRI, S., DE MEERSCHMAN, F., RETTIGNER, C., FOCANT, C., LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.25-32, 2004.

LEFÈVRE, L., LUGO-VILLARINO, G., MEUNIER, E., VALENTIN, A., OLAGNIER, D., AUTHIER, H., DUVAL, C., DARDENNE, C., BERNAD, J., LEMESRE, J. P., AUWERX, J., NEYROLLES, O., PIPY, B., COSTE, A. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. **Immunity**, v. 38, p. 1038-1049, 2013.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S., GROSS, O., ROBINSON, M. J., OSORIO, F., SLACK, E. C., TSONI, S. V., SCHWEIGHFFER, E., TYBULEWICZ, V., BROWN, G. D., RULAND, J., REIS E SOUZA, C. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nature Immunology**, v.8, p.630–38, 2007.

MACÊDO-JUNIOR, A. G., CUNHA-JUNIOR, J. P., CARDOSO, T. H. S., SILVA, M. V., SANTIAGO, F. M., SILVA, J. S., PIROVANI, C. P., SILVA, D. A. O., MINEO, J. R., MINEO, T. W. P. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. **Parasites and Vectors**, v. 6, p. 1-12, 2013.

MANSILLA, F. C., FRANCO-MAHECHA, O. L., LAVORIA, M. A., MOORE, D. P., GIRALDEZ, A. N., IGLESIAS, M. E., WILDA, M., CAPOZZO, A. V. The immune enhancement of a novel soy lecithin/ β -glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. **Vaccine**, v. 30, p. 1124-1131, 2011.

MARAKALALA, M. J., VAUTIER, S., POTRYKUS, J., WALKER, L.A., SHEPARDSON, K. M., HOPKE, A., MORA-MONTES, H. M., KERRIGAN, A., NETEA, M. G., MURRAY, G. I., MACCALLUM, D. M., WHEELER, R., MUNRO, C. A., GOW, N. A. R., CRAMER, R. A., BROWN, A. J. P., BROWN, G. D. Differential Adaptation of *Candida albicans* In Vivo Modulates Immune Recognition by Dectin-1. **Plos Pathogens**, v. 9, e 10033315, 2013.

MARIM, F. M., SILVEIRA, T. N., LIMA, D. S., ZAMBONI, D. S. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PLoS One**, v. 5, p. e15263, 2010.

MENG, D. Y., JI, C. F., JI, Y. B. Synthesis of different degree of substitution of LAMS and preliminary study on physical and chemical properties. **Progress in Modern Biomedicine**, v. 12, p.2298–2301, 2012.

MINEO, T. W. P., ALENIUS, S., NÄSLUND, K., MONTASSIER, H. J., BJÖRKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 188-192, 2006.

MINEO, T. W., BENEVIDES, L., SILVA, N. M., SILVA, J. S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Research**, v. 40, n. 4, p. 32- 44, 2009.

MINEO, T. W., CARRASCO, A. O., RASO, T. F., WERTHER, K., PINTO, A. A., MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 352-355, 2011.

MINEO, T. W., OLIVEIRA, C. J., GUTIERREZ, F. R., SILVA, J. S. 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.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos> >. Acesso em: 02 Dez. 2013.

MOCSAI, A., RULAND, J., TYBULEWICZ, V. L. J. The SYK tyrosine Kinase: a crucial player in diverse biological functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 387-402, 2010.

MOORE, D. P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.87-97, 2005.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v.100, p.633-636, 2007.

MULLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASHAY, T. Chemokines-natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medicine Microbiology Immunology**, v. 190, n. 1, p. 73-76, 2011.

MURAMATSU, D., IWAI, A., SHIHO, A., UCHIYAMA, H., KAWATA, K., NAKAYAMA, Y., NIKAWA, Y., KUSANO, K., OKABE, M., MIYAZAKI, T. β -Glucan derived from *Aureobasidium pullulans* effective for the prevention of influenza in mice. **Plos one**, v.7, p. 1-9, 2012.

MURAMATSU, D., IWAI, A., SHIHO, A., UCHIYAMA, H., KAWATA, K., NAKAYAMA, Y., NIKAWA, Y., KUSANO, K., OKABE, M., MIYAZAKI, T. β -Glucan derived from *Aureobasidium pullulans* effective for the prevention of influenza in mice. **Plos one**, v. 7, p 1-9, 2012.

NETEA, M. G., GOW, N. A., JOOSTEN, L. A., VERSCHUEREN, I., VAN DER MEER, J. W., KULLBERG, B. J. Variable recognition of *Candida albicans* strains by TLR4 and lectin recognition receptors. **Medical Mycology**, v.48, p. 897–903, 2010.

ORDEIX, L., LLORET, A., FONDEVILA, D., DUBEY, J. P., FERRER, L., FONDATI, A. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**,. v. 38, n. 5, p. 415-419, 2002.

ORTEGA-MORA, L.M., FERRE, I., DEL-POZO, I., CAETANO-DA-SILVA, A., FERNANDEZ, E. C., CERRILLO, J. R., GARAGALZA, C. U., ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**,. v. 117, p. 301-308, 2003.

PANADERO, R., PAINCEIRA, A., LOPEZ, C., VAZQUEZ, L., PAZ, A., DIAZ, P., DACAL, V., CIENFUEGOS, S., FERNANDEZ, G., LAGO, N., DIEZ-BANOS, P., MORRONGO, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Research Veterinary Science**,. v. 88, p. 111–115, 2010.

PARÉ, J., THURMOND, M. C., HIETALA, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 133-139, 1996.

PATITUCCI, A.N.; PÉREZ, M.J.; ROZAS, M.A. et al. Neosporosis canine: detection of sera antibodies in rural and urban canine population of Chile. **Archive Veterinary Medicine**,. v. 33, p. 227-232, 2001.

PERLÉ, K. M. D., DEL PIERO, F. CARR, R. F., HARRIS, C., STROMBERG, P. C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. **Journal Veterinary Investigation**. v. 13, p. 252-255, 2001.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478–482, 1997.

REICHEL, M. P., AYANEGUI-ALCÉRRECA, M. A., GONDIM, L. F. P., ELLIS, J. T.: What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal Parasitology**, v. 43, p. 133-142, 2013.

REICHEL, M. P., ELLIS, J. T. *Neospora caninum* – how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortions in cattle? **International Journal Parasitology**, v. 39, p. 1173-1187, 2009.

REIS E SOUSA, C., YAP, G., SCHULZ, O., ROGERS, N., SCHITO, M., ALIBERTI, J., HIENY, S., SHER, A. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. **Immunity**, v. 11, n. 5, p. 637-647, 1999.

RIBEIRO, D. P., FREITAS, M. M. P., CARDOSO, M. R. D., PAJUABA, A. C. A. M., SILVA, N. M., MINEO, T. W. P., SILVA, J. S., MINEO, J. R., SILVA, D. A. O. CpGODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, v. 27, p. 2570-2579, 2009.

RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharinalongicruris*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 586–1595, 2010.

ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNÁNDES, E., PÉREZ-ZABALLOS, F., RODRÍGUEZ-MARCOS, S., BLANCO-MURCIA, J., RODRÍGUEZ-BERTOS, A., PRENAFETA, A., ORTEGA-MORA, L. M. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. **Veterinary Research**, v. 44, p. 1-13, 2013.

ROMERO, J. J., PÉREZ, E., FRANKENA, K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 149-59, 2004.

ROTHFUCHS, A. G., BÁFICA, A., G. C.G., EGEN, J. G., WILLIAMS, D. L., BROWN, G. D., SHER, A. Dectin-1 Interaction with *Mycobacterium tuberculosis* Leads to Enhanced IL-12p40 Production by Splenic Dendritic Cells. **Journal Immunology**, v. 176, p. 3463-3471, 2010.

SAIJO, S., FUJIKADOL, N., FURUTA, T., CHUNGI, S. H., KOTAKIL, H., SEKIL, K., SUDOL, K., AKIRA, S., ADACHI, Y., OHNO, N., KINJO, T., NAKAMURA, K., KAWAKAMI, K., IWAKURAL, Y. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. **Nature Immunology**, v. 8, p. 39-46, 2007.

SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BARWALD, A., CONRATHS, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 87-98, 1998.

SCHEPETKIN, I. A., QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317-333, 2006.

SCOTT, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. **Immunology Research**, v. 27, p. 489-498, 2003.

SPILOVSKÁ, S., REITEROVÁ, K., KOVÁCOVÁ, D., BOBÁKOVÁ, M., DUBINSKY, P. The first finding of *Neospora caninum* and the occurrence of other abortifacient agents in sheep in Slovakia. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 320-323, 2009.

SPOONER, R., YILMAZ, O. The Role of Reactive-Oxygen-Species in Microbial Persistence and Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 334-352, 2011.

TANAHA, T., HAMADA, T., INOUE, N., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., MIKAMI, T. 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.

TANAKA, T., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., SUZUKI, N., MIKAMI, T. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. **Parasitology research**, v. 86, p. 768-771, 2000.

TEIXEIRA, M. M., FERNANDES, J. D., TEIXEIRA, C. R., ANDRADE, B. B., POMPEU, M. M. L., SILVA, J. S., BRODSKYN, C. L., BARRALNETTO, M., BARRAL, A. Distinct courses of cutaneous leishmaniasis are dependent on early chemokine expression patterns. **Infection Immunity**,. v. 73, p. 1191-1195, 2005.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M., JAKUBEJ, E. B., THEBO, P., KINDAHL, H., BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal Parasitology**,v.28, p.1467-1472, 1998.

VIRIYAKOSOL, S., JIMENEZ, M. D. P., GURNEY, M. A., ASHBAGH, M. E., FIERER, J. Dectin-1 is Required for Resistance to Coccidioidomycosis in Mice. **American Society for Microbiology**,. v.4, doi:10.1128/mBio.00597-12, 2013.

WAHAB, T., EDVINSSON, B., PALM, D., LINDH, J. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of clinical microbiology**,v. 48, p591-2, 2010.

WASMUTH, J. D., PSZENNY, V., HAILE, S., JANSEN, E. M., GAST, A. T., SHER, A., BOYLE, J. P., BOULANGER, M. J., PARKINSON, J., GRIGG, M. E. Integrated Bioinformatic and Targeted Deletion Analyses of the SRS Gene Superfamily Identify SRS29C as a Negative Regulator of *Toxoplasma* Virulence. **American Society for Microbiology**,v 3, doi:10.1128/mBio.00321-12, 2012.

WERNER, J. L.; METZ, A. E.; HORN, D.; SCHOEB, T. R.; HEWITT, M. M.; SCHWIEBERT, L. M.; FARO-TRINDADE, I. ; GORDON D. BROWN, G. D.; STEELE, C. Requisite role for the Dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 4938-46, 2009.

WESTEN, J. F., HEUER, C., WILIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoites vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.103, p. 136-144, 2012.

WHILEY, R. A., CRUCHLEY, A. T., GORE, C., HAGI-PAVLI, E. *Candida albicans* strain dependent modulation of pro-inflammatory cytokine release by in vitro oral and vaginal mucosal models. **Cytokine**, v. 57, p. 89–97, 2012.

WILLIAMS, D. J. L., TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum* infected cattle. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 61-67, 2006.

WILLMENT, J. A., MARSHALL, A. S., REID, D. M., WILLIAMS, D. L., WONG, S. Y., GORDON, S., BROWN, G. D. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. **European Journal of Immunology**, v.35, n.5, p. 1539-47, 2005.

XIE, J., GUO, L., RUAN, Y., ZHU, H., WANG, L., ZHOU, L., YUN, X., GU, J. Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, p.958-962, 2009.

YU, X., CHEN, N., HU, D., ZHANG, W., LI, X., WANG, B., KANG, L., LI, X., LIU, Q., TIAN K. detection of *Neospora caninum* from farm-bred young blue foxes (*Alopex lagopus*) in china. **Journal veterinary Medicine Science**, v. 71, p. 113-115, 2009.

ZHU, J., YAMANE, H., PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review Immunology**, v.28, p. 445-489, 2010.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 100/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 041/09

Projeto Pesquisa: “Avaliação dos receptores Toll 2 e 4 e moléculas adaptadoras MyD88 na resposta imune inicial ao *Neospora caninum*”.

Pesquisador Responsável: Tiago Wilson Patriarca Mineo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 23 de junho de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente do CEUA/UFU