UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Função da galectina-1 na resistência do hospedeiro contra a
infecção experimental por *Neospora caninum***

Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Função da galectina-1 na resistência do hospedeiro contra a
infecção experimental por *Neospora caninum***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 17/02/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Vigato-Ferreira, Isabel Cristina Costa

Função da galectina-1 na resistência do hospedeiro contra a infecção experimental por *Neospora caninum*. Ribeirão Preto, 2016.

115 p.: il.; 30cm.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Yatsuda, Ana Patrícia.

1. *Neospora caninum*. 2. Galectina-1. 3. Infecção. 4. Imunomodulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira

Título do trabalho: Função da galectina-1 na resistência do hospedeiro contra a infecção experimental por *Neospora caninum*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“Senhor Deus, eu Te agradeço de todo o coração
pelo Teu amor e Tua fidelidade,
pois tens mostrado que o Teu nome
e as Tuas promessas estão acima de tudo.
Quando Te chamei, Tu me respondeste
e com o Teu poder me deste força e coragem...
O Teu amor, Senhor, permanece para sempre...
Não abandones a obra que começaste!”*

Dedicatória

A Deus, por ter me concedido a graça do seu amor, por ser minha fortaleza e por ter me acompanhado fielmente durante a realização deste estudo, iluminando meu caminho, mostrando as direções e dando sabedoria para conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Samuel, por estar ao meu lado desde o início da vida acadêmica, seguindo os mesmos passos, buscando os mesmos sonhos, vivenciando as mesmas conquistas, por ser sempre o meu suporte, o meu incentivador e, principalmente, pelo seu companheirismo e seu amor. Você é coautor desta conquista!

Aos meus pais, Moacir e Doroti, por terem me oferecido a oportunidade de crescer através dos estudos e, então, optar pela vida acadêmica. Agradeço o incentivo, a confiança, os seus ensinamentos e o amor de vocês, que foram essenciais na caminhada dessa minha formação.

*Aos meus irmãos, Humberto e Ricardo,
minha avó Dolores e familiares, pelos
conselhos, incentivo e momentos de
alegria;*

*aos meus sobrinhos, Helena, Ana Luisa e
João Gabriel, por me fazerem sorrir em
meio a qualquer situação;*

*à família do meu marido, que é minha
também, pela amizade e força sempre.*

Agradecimientos

Agradeço, primeiramente, à Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, minha orientadora, por ter aceitado embarcar neste sonho do doutorado comigo. Agradeço pela oportunidade, confiança em mim depositada, seu exemplo de ética e profissionalismo, e por nos ensinar a agir com resiliência sempre. Ana, muito obrigada, por todos os ensinamentos. Aprendi muito com você!

Ao amigo e colega de laboratório Luiz Miguel Pereira, meu fiel companheiro de experimentos, agradeço pela sua responsabilidade, disposição em ajudar e por me ensinar tanto. Buda, você foi fundamental para a conclusão deste trabalho! Agradeço também à Cássia Mariana Bronzon, sua esposa e minha amiga, por seu auxílio na condução dos ensaios, por ser minha companheira de Imunologia e, por sua amizade, não só durante os experimentos.

À amiga farmacêutica-bioquímica e técnica do nosso laboratório, Maraísa Palhão Verri, muito obrigada pela amizade, companhia e auxílio diário no desenvolvimento de cada experimento.

Agradeço também aos amigos de laboratório Alexandre, Luciana, Bruno e Júlia, por compartilharem comigo suas ideias e seus dia-a-dia e por me auxiliarem, de uma maneira ou outra, na execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi e todo o seu laboratório, em especial à Lilian Cataldi Rodrigues e Thalita Bachelri Riul, agradeço pela colaboração com este trabalho, fornecimento da galectina utilizada no estudo e por tamanha atenção disponibilizada para nos auxiliar com este estudo.

Agradeço à biomédica Fabiana Rossetto de Moraes, da FCFRP-USP, pela atenção e valioso auxílio na realização das leituras no citômetro de fluxo; da mesma forma, agradeço ao farmacêutico Eduardo Tozatto na realização das leituras de microscopia confocal.

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP, agradeço por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para o uso de alguns equipamentos;

Ao funcionários do Biotério da FCFRP-USP, agradeço pela prontidão em ajudar e auxílio na manutenção dos animais de experimentação.

À secretária do DACTB, Vânia Cláudia de Albuquerque, pelo grande auxílio na confecção do resumo em espanhol.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Henrique Theodoro, por sua atenção e disposição em nos auxiliar sempre.

Aos professores do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP, obrigada por contribuírem para o meu aprendizado e crescimento acadêmico;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo, agradeço a oportunidade de realização do curso de Doutorado;

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (processo 2012/11669-6); e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado;

Às amigas Miliane Rodrigues Frazão e Heliara Maria Spina Canela pela amizade, inúmeros momentos de alegria e por me receberem tão bem em sua casa durante a finalização deste trabalho.

Aos amigos que estiveram comigo e torceram por mim durante o desenvolvimento deste trabalho, pela troca de experiências, obrigada pelos inúmeros momentos de alegria;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Apoio financeiro:

***Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
processo 2012/11669-6 - auxílio pesquisa***

***Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
processo 153914/2015-7 - bolsa de doutorado***

***Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) -
bolsa de doutorado***

RESUMO

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. **Função da galectina-1 na resistência do hospedeiro contra a infecção experimental por *Neospora caninum***. 2016. 115f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neospora caninum (Nc) é um protozoário Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório, causador da neosporose, uma doença clínica indicada como uma das principais causas de aborto, morte neonatal e infertilidade em bovinos, representando um importante problema de saúde veterinária com grande impacto econômico no mundo todo. Galectina-1 (gal-1), uma proteína ligante de β -galactosídeos, exibe diversas atividades biológicas em muitas doenças inflamatórias, mas nada foi descrito até o momento sobre a gal-1 na infecção por Nc. Este trabalho foi desenvolvido para avaliar o efeito da gal-1 (tanto endógena quanto exógena) na infecção experimental murina por *N. caninum* e o efeito da gal-1 exógena sobre a invasão celular de *N. caninum* em ensaios *in vitro*. Primeiramente, foram realizados ensaios para investigar a capacidade de ligação da gal-1 com taquizoítas de Nc e seu papel na invasão *in vitro* por Nc em diferentes modelos celulares. Nesses ensaios, gal-1 mostrou ligar-se aos taquizoítas de Nc via CRD (domínio de reconhecimento de carboidrato) de maneira dose-dependente. Tanto células VERO, quanto macrófagos e esplenócitos mostraram ser modelos eficazes para o estudo *in vitro* do processo de invasão e proliferação de Nc, porém, gal-1 não interfere no processo de invasão. Para os ensaios *in vivo*, camundongos C57BL/6 machos selvagens (WT^{gal-1+/+}) e geneticamente deficientes de gal-1 (KO^{gal-1-/-}) foram infectados com taquizoítas de Nc1-lacZ, por via intraperitoneal, e tratados com gal-1 exógena por 7 dias. Aos 5, 8 e 15 dias pós-infecção, foram avaliados diversos parâmetros imunológicos, como carga parasitária peritoneal e produção de óxido nítrico por células da cavidade peritoneal, perfil celular do peritônio e baço, produção de citocinas por células T, quantificação de anticorpos específicos anti-Nc e quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas. A ausência de galectina-1 endógena levou ao aumento da produção de óxido nítrico (NO), da população de macrófagos F4/80⁺ peritoneais e da secreção de IL-6. Porém, essa deficiência de gal-1 levou à redução da população de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) produtores de IFN- γ , diminuição da ativação de linfócitos B e da secreção de IFN- γ e IL-10. Com relação aos camundongos WT^{gal-1+/+}, foi destacada a contribuição da gal-1 exógena para estimular a produção de NO, promover o aumento do número de células F4/80⁺, induzir a secreção de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-6, além de aumentar a produção de IgG e IgM. Em animais KO^{gal-1-/-}, em contrapartida, foi observado um efeito imunorregulatório dessa galectina exógena sobre a resposta à infecção, caracterizado pelo aumento da carga parasitária peritoneal e diminuição da população de macrófagos (F4/80⁺) produção de NO na cavidade peritoneal. Além disso, e em conformidade com o perfil regulatório da resposta, foi possível observar a diminuição da população de linfócitos TCD8⁺ produtores de IFN- γ e aumento das células T (CD4⁺ e CD8⁺) produtoras de IL-10 nos animais infectados e tratados, que corroborou com a secreção destas citocinas por células esplênicas. Com base nestes resultados, sugerimos que a gal-1 endógena media perfis imunológicos da resposta do hospedeiro, inibindo mecanismos efetores da resposta inata e estimulando a resposta adaptativa contra o parasita *N. caninum* e que a suplementação com gal-1 exógena gera uma imunorregulação na resposta do hospedeiro contra o parasita *N. caninum*. Nosso trabalho é pioneiro no estudo da interação da gal-1 na infecção com Nc e, embora seja um investigação inicial dos

mecanismos imunológicos envolvidos nesse processo, sugere uma ação da gal-1 na modulação da resposta imunológica contra *N. caninum*.

Palavras-chave: 1. *Neospora caninum*. 2. Galectina-1. 3. Infecção. 4. Imunomodulação.

ABSTRACT

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. **The function of Galectin-1 on host resistance against experimental *Neospora caninum* infection.** 2016. 115f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neospora caninum (Nc) is an apicomplexa protozoan, an obligate intracellular parasite that causes neosporosis, a clinical disease indicated as one of the main causes of abortion, neonatal death and infertility in cattle, representing an important veterinary health problem with great economic impact worldwide. Galectin-1 (gal-1), a β -galactosidase binding protein, exhibits several biological activities in many inflammatory diseases. This work was aimed to evaluating the effect of gal-1 (both endogenous and exogenous) on *N. caninum* infection and the effect of exogenous gal-1 on the *in vitro* cellular invasion of *N. caninum*. Firstly, assays were developed to investigate the binding capacity of gal-1 with Nc tachyzoites and the role of this lectin in *in vitro* invasion process by Nc. Different cell models were used and VERO cells, macrophages and splenocytes proved to be effective models for the study of the Nc invasion and proliferation process. However, although galectin-1 has the ability to bind to Nc via CRD in a dose-dependent manner, this lectin does not interfere with the invasion process. For the *in vivo* assays, wild-type (WT^{gal-1+/+}) and genetically deficient gal-1 mice (KO^{gal-1-/-}) were intraperitoneally infected with Nc1-lacZ tachyzoites and treated with gal-1 for 7 days. At 5, 8 and 15 days post infection, various immunological parameters were evaluated, such as peritoneal parasite load and nitric oxide production by peritoneal cells, peritoneal and spleen cell profile, cytokine production by T cells, quantification of specific anti-Nc and quantification of cytokines in splenic cell culture supernatants. The absence of endogenous galectin-1 led to increased nitric oxide, peritoneal F4/80⁺ macrophage population and IL-6 secretion. However, gal-1 deficiency decreased the population of T cells (CD4⁺ and CD8⁺) producing IFN- γ , the B lymphocyte activation and the secretion of IFN- γ and IL-10. With respect to WT^{gal-1+/+} mice, we can highlight a contribution of exogenous gal-1 to stimulating NO production, promoting the increase of F4/80⁺ cells, inducing the secretion of IFN- γ , IL-10, IL-4 and IL-6, in addition to increasing the production of IgG and IgM. In contrast, an immunoregulatory effect of this galectin in response to infection was observed in the KO^{gal-1-/-} animals. It was observed an increased peritoneal parasite burden, decreased macrophage (F4/80⁺) population and NO production by these cells in the peritoneal cavity. In addition, in agreement with the regulatory profile of the response, it was observed a decrease of the CD8⁺ T cells population producing IFN- γ and increased T cells (CD4⁺ and CD8⁺) producing IL-10, which corroborated with the secretion of these cytokines by the splenic cells. Based on these results, we suggest that endogenous gal-1 mediates immunological profiles of host response by inhibiting innate effector mechanisms and stimulating an adaptive response against *N. caninum*. Furthermore, exogenous gal-1 immunoregulate the host immune response against the parasite. Our work is a pioneer in studying the interaction of gal-1 in Nc infection and, although it is an initial investigation of the immunological mechanisms, our data suggests role of gal-1 in the modulation of the immune response against *N. caninum*.

Keywords: 1. *Neospora caninum*. 2. Galectin-1. 3. Infection. 4. Immunomodulation.

RESUMEN

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. **Actuación de la galectina-1 en la resistencia del hospedero contra la infección experimental por *Neospora caninum***. 2016. 115f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neospora caninum (Nc) es un protozooario apicompleja, parásito intracelular imprescindible causador de la neosporosis, una enfermedad clínica indicada como una de las principales causas de aborto, muerte neonatal e infertilidad en bovinos, representando un importante problema de salud veterinaria con grande impacto económico en todo el mundo. Galectina-1 (gal-1), una proteína ligante de β -galactosidasa exhibe diversas actividades biológicas en muchas enfermedades inflamatorias, pero nada ha sido descrito sobre gal-1 en la infección por Nc. Este trabajo fue desarrollado para evaluar el efecto gal-1 (endógena y exógena) en la infección experimental murina por *N. caninum* y el efecto de gal-1 exógena sobre la invasión celular de *N. caninum* en ensayos *in vitro*. Primeramente fueron realizados ensayos para investigar la capacidad de ligación de gal-1 con taquizoitos de Nc y su papel en la invasión *in vitro* por Nc en diferentes modelos celulares. Tanto células VERO cuanto macrófagos y esplenocitos mostraron ser modelos eficaces para el estudio *in vitro* del proceso de invasión y proliferación de Nc pero, aunque galectina-1 sea capaz de ligarse a los taquizoitos de Nc vía CRD y de manera dosis dependiente, esa lectina no interfiere en el proceso de invasión. Para los ensayos *in vivo*, ratones machos salvajes (WT^{gal-1+/+}) y genéticamente deficientes de gal-1 (KO^{gal-1-/-}) fueron infectados con taquizoitos de Nc1-lacZ por vía intraperitoneal y tratados con gal-1 exógena por 7 días. A los 5, 8 y 15 días pos infección diversos parámetros inmunológicos fueron evaluados, como carga parasitaria peritoneal y producción de óxido nítrico por células de la cavidad peritoneal, perfil celular del peritoneo y bazo, producción de citocinas por células T, cuantificación de anticuerpos específicos anti Nc y cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de cultura de células esplénicas. La ausencia de galectina-1 endógena acarrió un aumento en la producción de óxido nítrico de la población de macrófagos F4/80⁺ peritoneales y de la secreción de IL-6, pero esa deficiencia de gal-1 acarrió una reducción de la población de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) productores de IFN- γ , disminución de la activación de linfocitos B y de la secreción de IFN- γ e IL-10. Con relación a los ratones WT^{gal-1+/+} fue destacada la contribución de gal-1 exógena para estimular la producción de ON, promover el aumento del número de células F4/80⁺ inducir la secreción de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-6, además de aumentar la producción de IgG e IgM. En animales KO^{gal-1-/-} se observó un efecto inmunorregulador de esa galectina exógena sobre la respuesta a la infección, caracterizado por el aumento de la carga parasitaria peritoneal y disminución de la población de macrófagos (F4/80⁺) y producción de ON en la cavidad peritoneal. Además y conforme el perfil regulador de la respuesta, fue posible observar la disminución de la población de linfocitos TCD8⁺ productores de IFN- γ y aumento de las células T (CD4⁺ y CD8⁺) productoras de IL-10 en los animales infectados y tratados, lo que corroboró con la secreción de estas citocinas por células esplénicas. Basado en estos resultados sugerimos que la gal-1 endógena modera perfiles inmunológicos de la respuesta del hospedero, inhibiendo mecanismos efectores de la respuesta innata y estimulando la respuesta adaptativa contra el parásito *N. caninum* y que la suplementación con gal-1 exógena genera una inmunorregulación en la respuesta del hospedero contra el parásito *N. caninum*. Nuestro trabajo es pionero en el estudio de la interacción de gal-1 en la infección con Nc y aunque sea una

investigación inicial de los mecanismos inmunológicos involucrados en ese proceso, sugiere una acción de gal-1 en la modulación de la respuesta inmunológica contra *N. caninum*.

Palabras-clave: 1. *Neospora caninum*. 2. Galectina-1. 3. Infección. 4. Inmunomodulación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Neospora caninum</i>	04
Figura 2. Classificação das galectinas de mamíferos.....	10
Figura 3. Fluxograma das atividades desenvolvidas.....	20
Figura 4. Citogramas e histogramas de fluorescência representativos dos ensaios de imunofenotipagem da população de linfócitos.....	36
Figura 5. Citogramas representativos dos ensaios de imunofenotipagem da população de leucócitos não-linfócitos.....	37
Figura 6. Citograma e histogramas de fluorescência da análise da capacidade de ligação de gal-1 com taquizoítas de Nc por citometria de fluxo.....	44
Figura 7. Avaliação da capacidade de ligação de gal-1 com taquizoítas de Nc via domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) por citometria de fluxo.....	45
Figura 8. Avaliação da capacidade de ligação da gal-1 com taquizoítas de Nc de maneira dose-dependente por citometria de fluxo.....	46
Figura 9. Análise do perfil de ligação de galectina-1 com <i>N. caninum</i> por microscopia confocal - controle negativo.....	47
Figura 10. Análise do perfil de ligação de galectina-1 com <i>N. caninum</i> por microscopia confocal – linhagem Nc1-selvagem.....	48
Figura 11. Microfotografias da análise do perfil de ligação de galectina-1 com <i>N. caninum</i> por microscopia confocal – Nc1-LacZ.....	49
Figura 12. Avaliação da ação da galectina-1 sobre a invasão de <i>N. caninum</i> em células VERO.....	50
Figura 13. Avaliação da ação da galectina-1 sobre a invasão de <i>N. caninum</i> em macrófagos.....	51
Figura 14. Ensaio de proliferação de <i>N. caninum</i> em células esplênicas.....	52
Figura 15. Ensaio de proliferação de <i>N. caninum</i> em macrófagos.....	52
Figura 16. Peso dos baços dos camundongos WT ^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	54
Figura 17. Peso dos baços dos camundongos KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	54
Figura 18. Análise comparativa do tamanho dos baços de camundongos WT ^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	55

Figura 19. Quantificação de <i>N. caninum</i> por CPRG em células da cavidade peritoneal de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	56
Figura 20. Produção de óxido nítrico pelas células da cavidade peritoneal de animais WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	58
Figura 21. Caracterização fenotípica de células provenientes da cavidade peritoneal de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	61
Figura 22. Expressão de MHC em células provenientes do lavado peritoneal de camundongos WT ^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	63
Figura 23. Expressão de TLR2 em células provenientes do lavado peritoneal de camundongos WT ^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	64
Figura 24. Caracterização fenotípica das populações celulares provenientes do baço de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	66
Figura 25. Expressão de CD80 e CD86 em células B (CD19 ⁺) do baço de camundongos WT ^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	67
Figura 26. Expressão de MHCII em células B (CD19 ⁺) do baço de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	68
Figura 27. ELISA para a detecção de anticorpos específicos (IgG e IgM) anti- <i>N. caninum</i> em amostras de soro de camundongos WT ^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	70
Figura 28. Detecção intracelular de IFN- γ em células T CD4 ⁺ esplênicas de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	71
Figura 29. Detecção intracelular de IFN- γ em células TCD8 ⁺ esplênicas de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	73
Figura 30. Quantificação de IFN- γ secretado por células esplênicas de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	74
Figura 31. Detecção intracelular de IL-10 em células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ esplênicas de camundongos KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	75
Figura 32. Quantificação de IL-10 secretada por células esplênicas de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	76

Figura 33. Quantificação de IL-4 secretada por células esplênicas de camundongos WT ^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	77
Figura 34. Quantificação de IL-6 secretada por células esplênicas de camundongos WT ^{gal-1+/+} e KO ^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e delineamento experimental.....	28
Tabela 2. Marcadores celulares e respectivos anticorpos monoclonais.....	34
Tabela 3. Sumários dos resultados apresentados de forma qualitativa.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
Ac	anticorpo
ACK	tampão de lise de hemácias (<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>)
Ag	antígeno
ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpos
ANOVA	Análise de variância entre os grupos
APC	aloficocianina
APCs	células apresentadoras de antígenos
BSA	albumina de soro bovino
CD	<i>cluster</i> de diferenciação
CDs	células dendríticas
Con-A	concanavalina-A
CPRG	clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo
CRD	domínio de reconhecimento de carboidrato
DENV	vírus da dengue
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	dinucleotídeo trifosfato
DO	densidade ótica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FACS	seleção celular ativada por fluorescência (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
F4/80	marcador de superfície celular de macrófagos
Fc	fragmento cristalizável da molécula de anticorpo; porção Fc do anticorpo
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
FcR	receptor para a porção Fc
FcγR	receptor para a porção Fc gama; receptor para a IgG
FITC	isotiocianato de fluoresceína

fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FoxP3	regulador de transcrição de células T regulatórias
gal-1	galectina-1
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HBSS	solução salina balanceada de Hank
HIV	vírus da imunodeficiência humana
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
IC	imunocomplexo(s)
IFN-γ	<i>interferon-gamma</i>
IgG	imunoglobulina da classe G
IgM	imunoglobulina da classe M
IL-	interleucina
iNOS	enzima óxido nítrico sintase indutível
i.p.	intraperitonealmente
kDA	quilodalton
KO	nocaute (<i>knock-out</i>)
LPS	lipopolissacarídeo
Ly6G-Gr1	marcador de superfície celular de granulócitos
MHC	molécula do complexo de histocompatibilidade principal
MyD88	fator de diferenciação mielóide 88
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
Nc	<i>Neospora caninum</i>
Nc1-lacZ	cepa de <i>Neospora caninum</i> geneticamente modificada que expressa o gene lac-Z, que codifica a β -galactosidase
NETs	<i>neutrophils extracellular traps</i>
NK	células <i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
p	probabilidade de significância
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PAMP	padrões moleculares associados ao patógeno
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	ficoeritrina
PI	iodeto de propídeo
PMA	forbol miristato acetato

PMN	polimorfonucleares
PRR	receptores de reconhecimento de padrões
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécie(s) reativa(s) de oxigênio
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio de cultura celular (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SBF	soro bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	Tris- borato-EDTA
TGF-β	fator de transformação do crescimento – beta
Th	linfócitos T auxiliares (<i>helper</i>)
TLR	receptores Toll-like
TNF-α	fator de necrose tumoral – alfa
Treg	células T regulatórias
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
VERO	Células renais de macaco verde africano (<i>Verda Reno</i>)
WT	selvagem (<i>wild type</i>)
xg	unidade de medida da força centrífuga relativa

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Resumen	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. O parasita <i>Neospora caninum</i>	01
1.2. Infecção e transmissão do <i>N. caninum</i>	02
1.3. A resposta imune contra a infecção por <i>N. caninum</i>	04
1.4. Funções das galectinas, em especial galectina-1	09
1.5. Papel da galectina-1 nas infecções	13
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Delineamento Experimental	20
3.2. Manutenção <i>in vitro</i> e purificação do parasita <i>Neospora caninum</i>	21
3.2.1. Cepas de <i>Neospora caninum</i>	21
3.2.2. Cultivo e preparo do parasita	21
3.3. Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica (gal-1)	22
3.4. Ensaio <i>in vitro</i>	23
3.4.1. Avaliação da capacidade de ligação da galectina-1 com taquizoítas de <i>N. caninum</i>	23
3.4.1.1. Análise por citometria de fluxo	23
3.4.1.2. Análise por microscopia confocal	24
3.4.2. Avaliação da ação da galectina-1 sobre a invasão de <i>N. caninum</i> em células VERO	24
3.4.2.1. Incubação do parasita com a galectina-1	24
3.4.3. Ensaio de invasão	25
3.4.4. Detecção do parasita por Ensaio enzimático (CPRG)	25
3.4.5. Avaliação da proliferação de <i>N. caninum</i> em células esplênicas	26
3.4.5.1. Cultura de células esplênicas e inoculação do parasita	26
3.4.5.2. Detecção do parasita por Citometria de Fluxo	26
3.4.6. Avaliação da proliferação de <i>N. caninum</i> em macrófagos	27
3.5. Ensaio <i>in vivo</i>	27
3.5.1. Animais de experimentação	27
3.5.2. Infecção de camundongos por <i>N. caninum</i> e tratamento com gal-1	28

3.5.3. Eutanásia dos animais.....	29
3.5.4. Obtenção dos macrófagos peritoneais murinos.....	29
3.5.5. Detecção dos parasitas Nc1-lacZ intraperitoneais por precipitação de X-Gal..	29
3.5.6. Quantificação dos parasitas intraperitoneais por CPRG.....	30
3.5.7. Quantificação de óxido nítrico (NO) produzido por células do lavado peritoneal	30
3.5.8. Obtenção das células esplênicas murinas.....	30
3.5.9. Extratos proteicos totais de <i>N. caninum</i>	31
3.5.10. Ensaio de secreção de citocinas.....	31
3.5.10.1. Dosagem de citocinas por ELISA	32
3.5.11. Dosagem de anticorpos específicos para <i>N. caninum</i> por ELISA	32
3.5.12. Análise imunofenotípica das populações celulares por citometria de fluxo	33
3.5.13. Análise da expressão de citocinas intracelulares em células esplênicas.....	37
3.6. Análise estatística dos resultados.....	38
3.7. Principais equipamentos utilizados	38
3.8. Principais reagentes comerciais utilizados	39
3.9. Anticorpos utilizados para a Citometria de Fluxo	40
3.10. Principais soluções utilizadas	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Ensaios <i>in vitro</i>	43
4.1.1. Avaliação da capacidade de ligação da glectina-1 com taquizoítas de <i>N. caninum</i>	43
4.1.1.1. Análise por Citometria de Fluxo.....	43
4.1.1.2. Análise por Microscopia Confocal.....	46
4.1.2. Avaliação <i>in vitro</i> da ação da glectina-1 sobre a invasão de <i>N. caninum</i> em diferentes modelos celulares.....	50
4.1.3. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de proliferação de <i>N. caninum</i> no interior de diferentes modelos celulares.....	51
4.2. Ensaios <i>in vivo</i>	53
4.2.1. Influência da ação da glectina-1 sobre a resposta imune contra <i>N. caninum</i>	53
4.2.1.1. Análise do peso dos baços de camundongos infectados com Nc-lacZ.....	53
4.2.1.2. Quantificação do parasita <i>N. caninum</i> na cavidade peritoneal de camundongos infectados com Nc-lacZ.....	55
4.2.1.3. Avaliação da produção de óxido nítrico pelas células da cavidade peritoneal de camundongos infectados com Nc-lacZ	57
4.2.1.4. Caracterização fenotípica e funcional das populações celulares peritoneais de camundongos infectados com Nc-lacZ	59
4.2.1.5. Caracterização fenotípica e funcional das populações celulares provenientes dos baços de camundongos infectados com Nc-lacZ	65

4.2.1.6. Detecção/Quantificação dos anticorpos específicos para <i>N. caninum</i> em soro de camundongos infectados com Nc-lacZ	69
4.2.1.7. Quantificação de citocinas intracelulares e secretadas por células T esplênicas de camundongos infectados com Nc-lacZ.....	70
5. DISCUSSÃO.....	80
5.1. Papel da galectina-1 no processo de invasão por <i>N. caninum in vitro</i>	81
5.2. Papel da galectina-1 na resposta imune inata contra <i>N. caninum</i>	84
5.3. Papel da galectina-1 na resposta imune adaptativa contra <i>N. caninum</i>	91
5.4. Considerações Finais.....	96
6. CONCLUSÕES.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXOS	114
Anexo I: Parecer do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	115

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. O parasita *Neospora caninum*

Neospora caninum (Nc) é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, inicialmente descrito por Bjerkas e colaboradores (1984) como um protozoário desconhecido em amostras teciduais de cães com encefalomielite na Noruega (BJERKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Semelhanças morfológicas e bioquímicas, além do ciclo de vida com cinética parecida, levaram ao diagnóstico de *Toxoplasma gondii* como causador dos casos reportados (HEMPHILL, 1999). Apenas em 1988, *N. caninum* foi identificado como nova espécie (DUBEY et al., 1988) e, desde então, este parasita tem sido descrito como um agente causador de infecções em diferentes animais por todo o mundo (DUBEY; SCHARES, 2011; MONNEY; HEMPHILL, 2014). Embora haja divergências molecular, estrutural e morfológica entre essas duas espécies de protozoários, elas compartilham diversas características biológicas, imunológicas e estruturais (MÜLLER et al., 2013). Além disso, possuem uma baixa especificidade celular, sendo capazes de infectar inúmeros tipos celulares (DUBEY; LINDSAY, 2006) e levar tais células à destruição após extensa proliferação intracelular desses parasitas (HEMPHILL; AGUADO-MARTÍNEZ; MÜLLER, 2016).

N. caninum pode infectar uma ampla gama de animais de sangue quente, incluindo cabras, ovelhas e, principalmente, bovinos e, ocasionalmente, infectar roedores, mamíferos marinhos e pássaros (SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; REICHEL; ELLIS, 2009; ALMERÍA; LÓPEZ-GATIUS, 2013, 2015; DUBEY; REICHEL et al., 2014). Os hospedeiros definitivos reportados na literatura são os canídeos, a saber, cães (*Canis familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), dingo (*Canis dingo*) (KING et al., 2010) e lobo cinza (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011). No Brasil, o parasita está disseminado por todo o país (GONDIM et al., 2001), verificado através da soropositividade em bovinos de vários estados brasileiros, além de caprinos, cães, canídeos silvestres, gatos, ovinos, búfalos, cavalos, capivaras e jumentos (FUJII et al., 2001; FERNANDES et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2004; GENNARI et al., 2005, 2016; YAI et al., 2008; DUBEY; SCHARES, 2011; MORAES et al., 2011; JOSUÉ PIRES et al., 2014; RAIMUNDO et al., 2015; CAZAROTTO et al., 2016).

Desta ampla variedade de espécies com as quais o parasita entra em contato, causando neosporose, os animais que apresentam sinais clínicos mais importantes

são os cães e os bovinos. Nos cães, esta doença está associada, geralmente, a encefalomielites e infecções congênitas, podendo o parasita acometer os demais órgãos dos animais e levá-los a desordens respiratórias, cardíacas, digestórias, musculares e dermatológicas (DUBEY, 2003).

Em bovinos, a neosporose é reconhecida como uma doença clínica de grande impacto econômico (MCALLISTER, 2016), que afeta o desempenho da pecuária leiteira e de corte no mundo todo (GUY et al., 2001; HALL; REICHEL; ELLIS, 2005; REICHEL et al., 2013). O impacto econômico anual relacionado à neosporose, com base em dados de dez países com publicações relevantes, foi estimado em prejuízos econômicos de US\$ 1.298 bilhões anuais (HALL; REICHEL; ELLIS, 2005; REICHEL et al., 2013). Nas últimas décadas, *N. caninum* tem sido reconhecido como o maior responsável por aborto infeccioso parasitário ao redor do mundo, além de causador de morte neonatal e infertilidade em bovinos (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). A morte fetal e a mortalidade neonatal são responsáveis pelo principal impacto econômico da neosporose, mas gastos com o diagnóstico, auxílio profissional, bem como a redução da produção de leite e do ganho de peso do rebanho aumentam consideravelmente esse valor (MONNEY; HEMPHILL, 2014).

1.2. Infecção e transmissão de *N. caninum*

N. caninum apresenta ciclo biológico heteroxênico (Figura 1), com dois modos de reprodução: sexuada, que ocorre no hospedeiro definitivo, e assexuada, que se desenvolve no hospedeiro intermediário (REICHEL et al., 2014; SHAAPAN, 2015). O desenvolvimento compreende três formas evolutivas do parasita. O estágio proliferativo e responsável pela infecção aguda em hospedeiros intermediários é representado pelo taquizoíta. O taquizoíta pode invadir e se replicar rapidamente na grande maioria das células nucleadas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, incluindo células do sistema nervoso central, fibroblastos, endotélio vascular, células musculares e hepáticas e células do sistema imunológico (DUBEY et al., 2002; MONNEY; HEMPHILL, 2014), sendo capazes de disseminar através da corrente sanguínea e do sistema linfático do hospedeiro e induzir uma resposta imunológica (INNES et al., 2002; DUBEY, 2013;). O estágio de taquizoíta é limitado a 20 divisões, aproximadamente e, sobre pressões fisiológicas e/ou imunológicas do hospedeiro, são formados os bradizoítas (STROHBUSCH et al., 2009). Os bradizoítas se replicam bem mais lentamente, formam cistos nos tecidos e permanecem encistados,

geralmente em células nervosas e musculares esqueléticas, por toda a vida do hospedeiro intermediário (DUBEY et al., 1990; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013). O terceiro estágio invasivo, os esporozoítas, representam o produto final da reprodução sexuada, que ocorre no intestino de hospedeiros definitivos, seguidos pela esporulação no ambiente no interior de oocistos (HEMPHILL; AGUADO-MARTÍNEZ; MÜLLER, 2016), os quais podem sobreviver por longos períodos, e pode ser transmitido no rebanho bovino através da ingestão de água e alimento contaminado (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006).

A transmissão do parasita em bovinos ocorre por diferentes vias: horizontal ou transmissão pós-natal (pela ingestão de oocistos) e vertical ou transmissão congênita (transplacentária) (MCALLISTER et al., 1998; ALMERÍA; LÓPEZ-GATIUS, 2013). A transmissão congênita é altamente eficiente (75-100% das infecções maternas são transmitidas) e representa a principal via de infecção no campo (RAMOS et al., 2016), enquanto a transmissão após o nascimento raramente ocorre naturalmente (HALL; REICHEL; ELLIS, 2005). *N. caninum* pode ser transmitido por várias gerações (TREES; WILLIAMS, 2005; ALMERÍA et al., 2010), levando à perdas relacionadas ao aborto fetal, morte neonatal, redução de fertilidade e doenças clínicas e subclínicas de bezerros (WILLIAMS et al., 2000). A taxa de infecção pode decrescer devido ao desenvolvimento de imunidade contra o parasita (DIJKSTRA et al., 2003).

Embora o mecanismo preciso da causa do aborto não tenha sido totalmente elucidado, é de conhecimento que taquizoítas podem atravessar a barreira transplacentária ativamente e afetar a viabilidade fetal pela supressão de nutrientes e oxigênio, levando ao aborto (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014). A ausência de taquizoítas de *N. caninum* em tecidos fetais de camundongos infectados com o parasita sugere, entretanto, que a passagem de taquizoítas através da placenta não seja essencial para o aborto (QUINN et al., 2002a). Ainda não há um consenso a respeito do mecanismo que, efetivamente, leva à morte fetal, se é a própria invasão do parasita ou a resposta inflamatória citotóxica da mãe à infecção que é nociva ao feto (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006; INNES, 2007; ALMERÍA et al., 2010).

Figura 1. Ciclo biológico do *Neospora caninum*. Transmissão horizontal: canídeos (hospedeiros definitivos) adquirem o parasita através do consumo de carne infectada com cistos contendo bradizoítas, que são liberados e infectam células do epitélio intestinal, onde ocorre a reprodução sexuada. Canídeos excretam oocistos não esporulados nas fezes, os quais se tornam esporulados no ambiente. Bovinos (principal hospedeiro intermediário) ingerem água ou alimento contaminados e os esporozoítas são liberados dos oocistos e se transformam em taquizoítas. Esses taquizoítas se diferenciam em bradizoítas e formam cistos nos tecidos. O ciclo se completa quando o hospedeiro definitivo ingere carne contendo cistos. Transmissão vertical: ocorre pela passagem transplacentária de taquizoítas de mães infectadas para os fetos. Fonte: o autor.

1.3. A resposta imune contra a infecção por *N. caninum*

Diferentes células do sistema imune inato participam da imunidade protetora contra *N. caninum*. Os macrófagos são as células fagocíticas mais importantes em mamíferos e desempenham um papel fundamental na detecção e eliminação de patógenos intracelulares. Juntamente com as células dendríticas (CDs), os macrófagos fornecem a primeira linha de defesa mediada por células e são

fundamentais no controle da disseminação e proliferação de parasitas intracelulares (INNES et al., 2005; DONAHOE et al., 2015).

Dentre suas várias funções, essas células desempenham papel no reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como glicoproteínas ou glicolipídeos de superfície, através de seus receptores de reconhecimento padrões (PRR) (UEMATSU; AKIRA, 2006). A família de receptores *Toll-like* (TLR) é a classe de PRR melhor caracterizada em mamíferos, os quais, após serem induzidos, estimulam a produção de moléculas de superfície co-estimulatórias, secreção de citocinas e quimiocinas, que auxiliam na posterior apresentação de antígenos e na migração dessas células para os tecidos linfóides secundários (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

Sabe-se que as quimiocinas são uma grande família de proteínas quimiotáticas, que regulam a ativação e o recrutamento de leucócitos nos locais de inflamação por meio da interação com receptores de quimocina nessas células (MUELLER; STRANGE, 2004). A migração e ativação de células do sistema imune inato durante a fase inicial da infecção por *N. caninum*, via receptor de quimocina CCR5, é essencial para o controle do parasita, pois camundongos nocautes para o gene do CCR5 foram bem mais suscetíveis à infecção (ABE et al., 2015). Estudos também demonstraram que *N. caninum* produz moléculas únicas capazes de estimular a migração de células monocíticas para o local de infecção via CCR5, o que, consequentemente, aumenta a invasão e proliferação inicial do parasita (MINEO et al., 2010a).

Foi demonstrado que o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), um elemento crítico de sinalização após o reconhecimento microbiano pelo TLR, é essencial para a imunidade dependente de interferon- γ (IFN- γ) na neosporose. Nos animais MyD88 nocautes, os linfócitos não são estimulados a produzir IFN- γ no início da infecção, citocina crucial para o controle da proliferação do parasita (MINEO et al., 2009). Além disso, foi visto que o reconhecimento inicial do parasita por TLR2 participa na geração de respostas imunitárias efectoras contra *N. caninum* e, portanto, é crítico para a ativação de células dendríticas, resposta adequada de células T e produção de anticorpos, o que leva a uma redução da carga parasitária durante as fases aguda e crônica da infecção (MINEO et al., 2010b). Camundongos nocautes para TLR2 apresentaram uma resposta Th1 diminuída, pois houve um declínio tanto da proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas, quanto da razão IFN- γ /IL-10 e da síntese de subclasses de IgG, além de apresentarem maior carga parasitária em

comparação à camundongos selvagens. Assim, a via de reconhecimento inata TLR2/MyD88 é crítica para efetivamente estimular uma resposta imune adaptativa e levar a uma redução da carga parasitária durante as fases aguda e crônica da infecção (MINEO et al., 2010b).

As CDs são células apresentadoras de antígenos (APCs) muito potentes e participam da modulação da resposta imune primária. Foi demonstrado que ambas CDs esplênicas, tanto mieloides como plasmocitoides, possuem papel importante na resposta imune inata contra a infecção por *N. caninum* (TEIXEIRA et al., 2010). A ativação de CDs induzida por *N. caninum* está associada com a produção de IFN- γ por linfócitos T após a secreção de IL-12 (DION et al., 2011). Assim como as CDs, macrófagos também foram descritos como produtores de IL-12p70 durante os estágios iniciais da infecção por *T. gondii* em camundongos (LIU et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2010). A IL-12 é uma citocina fundamental envolvida na produção precoce de IFN- γ e na polarização de linfócitos TCD4⁺ e, consequentemente, na determinação do padrão de resposta Th1 (NISHIKAWA et al., 2001a). A produção de IL-12 por células infectadas por parasitas apicomplexa requer ativação da via de sinalização p38 MAPK (KIM et al., 2005). Foi visto que *N. caninum* pode manipular a fosforilação de p38 MAPK a seu favor, como um mecanismo de evasão da resposta inata do hospedeiro (MOTA et al., 2016).

Uma das principais funções efectoras dos macrófagos é a sua atividade de *killing* dos parasitas intracelulares associada ao aumento da produção de óxido nítrico (NO), que é também essencial para a resistência murina a *N. caninum* (NISHIKAWA et al., 2001a). Foi demonstrado que camundongos deficientes em óxido nítrico sintase indutível (iNOS), enzima produtora de NO, apresentam maior susceptibilidade à infecção por *N. caninum* do que o tipo selvagem (TANAKA et al., 2000a). Além disso, o NO exógeno desencadeia a conversão de taquizoíta-bradizoíta de *N. caninum* em culturas de células de queratinócitos murinos (VONLAUFEN et al., 2002). Na resposta imune inata, a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e metabólitos de óxido nítrico (NO), mecanismos efetores na morte do parasita por macrófagos ativados, desempenham importante efeito antiparasitário induzido por IFN- γ , resultando na inibição do crescimento do parasita (NISHIKAWA et al., 2001a, 2001b).

Embora as células *natural killer* (NK) tenham sido descritas como células efectoras primárias na infecção experimental com Nc em bovinos (BOYSEN et al., 2006; KLEVAR et al., 2007), dados na literatura sugerem que as células NK clássicas

não desempenham um importante papel na infecção aguda por *Nc* em modelo murino (NISHIKAWA et al., 2010).

Ainda com relação à resposta imune inata, estudos *in vitro* envolvendo células endoteliais bovinas evidenciaram um papel efetivo de neutrófilos na resposta contra *N. caninum*. Este parasita é capaz de estimular uma cascata de reações pró-inflamatórias e, rapidamente, ativar as células endoteliais, aumentando a expressão dos genes de moléculas de adesão em tais células e, consequentemente, levando à maior adesão desses polimorfonucleares em células endoteliais infectadas (TAUBERT et al., 2006).

O perfil de resposta imune adaptativa contra a invasão por *Neospora caninum* está associado ao padrão de resposta Th1, que é essencial para a proteção contra parasitas intracelulares. As citocinas IFN- γ e IL-12 desempenham função primordial no mecanismo protetor à infecção (INNES et al., 2005; DONAHOE et al., 2015). Em modelos murinos, a resistência do hospedeiro à neosporose está diretamente relacionada à produção de IFN- γ e IL-12 (KHAN et al., 1997; BASZLER et al., 1999; TANAKA et al., 2000a; CORREIA et al., 2015). A depleção de uma ou outra citocina em modelos nocaute ou no tratamento com anticorpos monoclonais levam o hospedeiro resistente a se tornar suscetível à infecção por neosporose (LONG; BASZLER, 2000; NISHIKAWA et al., 2001a; TANAKA et al., 2000b). A produção precoce de IFN- γ é importante para controlar a multiplicação do parasita intracelular (NISHIKAWA et al., 2001b) e, além disso, pode criar o ambiente de citocinas adequado para a ativação da resposta imune adaptativa Th1 (NISHIKAWA et al., 2001a). Após uma infecção primária, o IFN- γ ativa uma resposta pró-inflamatória que induz a conversão do taquizoíta à bradizoíta e a manutenção dos cistos teciduais (WILLIAMS et al., 2009).

Innes e colaboradores, em 1995, já evidenciaram a importância da resposta imune celular na infecção por *N. caninum*, demonstrando que o tratamento *in vitro* de células com IFN- γ inibiu a multiplicação do parasita em comparação com células não tratadas (INNES et al., 1995). Outros autores também demonstraram a atividade de citocinas como IFN- γ e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) na inibição *in vitro* da proliferação de taquizoítas de *N. caninum* (YAMANE et al., 2000).

Estudos *in vivo* demonstraram que células T desempenham o papel principal na resposta imunológica de hospedeiros murinos (CORREIA et al., 2013), sendo que os linfócitos T CD4⁺ citotóxicos estão envolvidos no *killing* de *N. caninum* através de uma

via dependente de granzimas (STASKA et al., 2003). Além disso, as células T CD8⁺ são fundamentais na produção de IFN- γ , um mecanismo protetor importante em modelo murino infectado por *N. caninum*, o que também foi observado experimentalmente em bovinos (CORREIA et al., 2013, 2015).

Hospedeiros bovinos desenvolvem uma resposta imune associada a altos níveis de IFN- γ , anticorpos IgG2 e linfócitos T do padrão Th1 (ANDRIANARIVO et al., 2005), um indicativo de que tanto a resposta imune mediada por célula quanto humoral são ativadas no controle da infecção. Em comparação com a imunidade mediada por células T, a resposta imune humoral, induzida durante o curso da infecção com Nc, está pouco caracterizada (TEIXEIRA et al., 2005; MONNEY; HEMPHILL, 2014). Estudos demonstraram uma maior suscetibilidade à infecção por Nc em camundongos C57BL/6 deficientes de célula B (EPERON et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que camundongos infectados com taquizoítas de Nc sofrem expansão das células B e uma produção dominante de IgG2a, direcionando uma resposta Th1 (TEIXEIRA et al., 2005).

Com relação à resposta imunológica contra Nc durante a prenhez, estudos demonstram que, além das citocinas Th1 (principalmente IFN- γ), citocinas do padrão Th2 e Treg também são reguladas positivamente durante o curso de infecção experimental (ALMERÍA et al., 2014). Sabe-se que a imunorregulação que ocorre na interface materno-fetal, com a expressão aumentada de IL-10, TGF- β , IL-4 e IL-5, pondera os efeitos das citocinas pró-inflamatórias, conferindo proteção ao feto (INNES, 2007; ALMERIA et al., 2016; DARWICH et al., 2016). Em contrapartida, na infecção por *N. caninum*, essa modulação da resposta Th1 contra o parasita favorece a proliferação do parasita e a transmissão vertical, podendo afetar a saúde do feto (QUINN; MILLER; ELLIS, 2004; INNES, 2007). Rosbottom e colaboradores (2011) demonstraram a resposta imune materna ativada em animais naturalmente infectados com *N. caninum*. Parasitas foram detectados na placenta e nos fetos com presença de células T CD4⁺ e CD8⁺, e grande aumento de IFN- γ , IL-12, TNF- α , e também de IL-4 e IL-10, mostrando uma mistura dos padrões Th1 e Th2 de resposta. Apesar da resposta imune estabelecida, não houve dano suficiente a ponto de causar a morte dos fetos, sugerindo que a sobrevivência do feto depende de sua imunocompetência no momento da infecção (ROSBOTTOM et al., 2011).

1.4. Funções das galectinas, em especial galectina-1

As galectinas são proteínas da família das lectinas, as quais se ligam a carboidratos de modo específico e são conhecidas como proteínas ligantes de glicanas (*glycan-binding protein*) (BLIDNER et al., 2015; KAMILI et al., 2016). As galectinas, formalmente conhecidas como lectinas do tipo S, se ligam a glicoconjugados animais com afinidade para resíduos beta-galactosídeos, que participam de vários processos biológicos e patológicos, incluindo a resposta imunológica adaptativa e inflamação (DHIRAPONG et al., 2009; VASTA, 2009; LIU; RABINOVICH, 2010). A família das galectinas é formada por lectinas homólogas nas sequências proteicas conservadas no domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (LIU, 2000; NIO-KOBAYASHI, 2016). Baseado nas características estruturais, as galectinas são classificadas em três tipos: *prototypical*, *chimera* e *tandem-repeat*. A maioria das galectinas pertence à classe *prototypical*, que contém um único CRD e existem como homodímeros (galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15); as *tandem-repeat* contém 2 CRD conectados por uma cadeia polipeptídica (galectina-4, 6, 8, 9 e 12); já a galectina-3, é a única *chimera* já descrita e tem estrutura particular, corresponde a um monômero com um único CRD (C-terminal) associado a um domínio regulatório (N-terminal), que contém repetições de uma sequência rica em prolina, glicina e tirosina (Figura 2) (LIU, 2000; LIU; RABINOVICH, 2010; VASTA, 2012; BLIDNER et al., 2015; RAPOPORT; BOVIN, 2015).

Figura 2. Classificação das galectinas de mamíferos. **A:** As galectinas são classificadas em três grupos de acordo com suas características estruturais: *prototypical*, *chimeric* e *tandem-repeat*. *Prototypical*: Galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15; *Chimeric*: Galectina-3; *Tandem-repeat*: Galectinas-4, -6, -8, -9, -12. Os domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) das galectinas apresentam aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos, sendo que apenas alguns desses resíduos interagem diretamente com os carboidratos. **B:** Representação das galectinas se ligando às glicanas da superfície de células hospedeiras. **C:** Representação da interação das galectinas com as glicanas da superfície de células hospedeiras e com as glicanas da membrana do patógeno. Adaptado de Vasta G.R., et al. *Frontiers in Immunology*, 2012, 3(33).

Várias células do sistema imunológico e outros tipos celulares expressam as galectinas, que podem participar de interações célula-matriz extracelular e modular funções celulares (LIU, 2000; LIU; RABINOVICH, 2010). Embora as galectinas não possuam um peptídeo sinal clássico de secreção, elas são encontradas também no espaço extracelular, não apenas no núcleo e citosol da célula (VASTA et al., 2012). Quando secretadas, as galectinas têm a capacidade de se ligar às glicanas da superfície das células em que são produzidas, de outras células no microambiente em que se encontram, ou ainda se ligar em glicanas da matriz extracelular e, assim,

modular tanto a resposta imune inata quanto adaptativa (SCHNAAR, 2016). Estas galectinas secretadas, ao contrário de citocinas e quimiocinas, não têm receptores específicos, mas podem mediar a comunicação entre as células do sistema imune através do reconhecimento de um grupo específico de glicoconjugados nas superfícies celulares (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Inicialmente as galectinas foram descritas como ligantes endógenos de glicanas *self*, capazes de mediar processos de diferenciação celular e organização tecidual e regular a homeostase imunológica (STOWELL et al., 2008; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008; SCHNAAR, 2016). Atividades intra e extracelulares foram descritas, nesse sentido, como a capacidade de apresentar interações bivalentes ou multivalentes com glicanas na superfície de várias células do sistema imune, exercendo funções como produção de citocinas e mediadores, adesão celular, apoptose e quimiotaxia. Intracelularmente, as galectinas podem participar nas vias de sinalização e modulação de respostas biológicas como apoptose, diferenciação celular e migração (LIU, 2000; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008; LIU; RABINOVICH, 2010). Essas galectinas também podem desempenhar funções importantes no desenvolvimento de inflamação aguda e crônica associadas com alergias, doenças autoimunes, aterosclerose, processos infecciosos e câncer (LIU; RABINOVICH, 2010; NIO-KOBAYASHI, 2016).

Posteriormente, tornou-se claro que as galectinas também possuem a propriedade de se ligar em glicanas *non-self* na superfície de patógenos, atuando como PRR no reconhecimento de uma variedade de vírus, bactérias, fungos e protozoários (VASTA, 2009), e, então, mediar as funções efetoras da resposta imune inata (SATO et al., 2009; VASTA, 2012; VASTA et al., 2012), propriedade já bem caracterizada para outros tipos de lectinas, as quais têm a capacidade de induzir a produção de óxido nítrico em macrófagos, bem como a secreção de citocinas. O potencial papel das galectinas como PRR tornou-se uma área de grande atenção. A diversidade do repertório de galectina em cada organismo e as variações na especificidade de cada galectina em relação às glicanas alvo, sugerem uma certa diversidade e plasticidade no reconhecimento de estruturas *non-self* por essas galectinas (VASTA, 2012).

Dentre os membros da família dessas lectinas, as galectinas 1 e 3 apresentam maior destaque no desempenho das atividades imunomoduladoras descritas anteriormente. A galectina-1 é uma proteína de 14kDa, existente na forma de homodímero e apresenta uma vasta distribuição tecidual e expressão aumentada em

condições patológicas, sendo produzida por diversos tipos celulares, incluindo algumas células do sistema imunológico (LIU, 2000; COOPER et al., 2012). É descrita na literatura por participar da homeostase de células da imunidade inata e adaptativa através da regulação do crescimento, progressão do ciclo celular e indução ou inibição de apoptose (RABINOVICH et al., 2007; STOWELL et al., 2007, 2008; DIAS-BARUFFI et al., 2010; COOPER et al., 2012).

O papel imunorregulador da galectina-1 nas funções dos leucócitos evidenciou sua capacidade de induzir apoptose em células T ativadas (RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002; BLIDNER et al., 2015), especificamente através da ligação ao receptor de células T (TCR) e sinalização (VESPA et al., 1999). Porém, estudos posteriores mostraram que a galectina-1 induz a exposição de fosfatidilserina independente das alterações no potencial mitocondrial, ativação das caspases ou morte celular e que mesmo expondo a fosfatidilserina, estas células não apresentaram alterações na morfologia de membrana, nem formação de *bleb* (extrusões na superfície), características típicas de células em apoptose (DIAS-BARUFFI et al., 2003; STOWELL et al., 2009). Apesar de a galectina-1 não interferir na viabilidade das células T, a mesma induz a produção de IL-10 e diminui a produção de IFN- γ por células T ativadas, sugerindo imunossupressão mediada pela galectina-1 *in vivo* (STOWELL et al., 2008). Recentemente, foi descrito que a indução de apoptose em células T é feita pela galectina-1 extracelular secretada, e não pela galectina intracelular. Porém, embora o mecanismo ainda não tenha sido elucidado, sabe-se que a galectina-1 intracelular regula a responsividade das células T à apoptose induzida pela galectina-1 extracelular (DEÁK et al., 2015).

Além disso, foi visto que a galectina-1 é capaz de elicitar a produção de IL-10, contribuindo para a proliferação de células T regulatórias (Treg) (VAN DER LEIJ et al., 2004) e suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002; RABINOVICH et al., 2007), levando a uma regulação do padrão de resposta patogênico Th1 para o não patogênico Th2.

Foi demonstrado também que a galectina-1 tem uma importante função em promover uma tolerância feto-maternal, por alterar o balanço de citocinas, direcionando para um perfil de resposta dominante anti-inflamatório (Th2) (BLOIS et al., 2007; BARRIENTOS et al., 2014). Isso provavelmente se explica devido ao maior potencial de ligação da galectina-1 em células Th1 que Th2, o que regula negativamente a resposta mediada por células Th1, pela indução da sua morte

(TOSCANO et al., 2007a). Blois e colaboradores (2007) demonstraram que animais nocaute para galectina-1 prenhes tiveram altas taxas de aborto e quando tratados com galectina-1 exógena os abortos deixaram de existir e houve o aumento dos níveis de IL-10. As funções imunomoduladoras de galectinas, principalmente gal-1, são críticas para a manutenção da gestação, e os autores chegam a sugerir que a galectina-1 possui potencial terapêutico em gestações ameaçadas (BLOIS et al., 2007, 2015). Neste sentido, nosso colaborador Marcelo Dias Baruffi possui uma patente licenciada (DIAS-BARUFFI et al., 2014), a qual o uso de gal-1 exógena é dirigido para aumentar taxa de fertilidade com incremento da implantação embrionária em vacas a serem submetidas à inseminação artificial ou na recepção de embriões. Atualmente, o produto é comercializado pela empresa Inpreha Biotecnologia com o nome comercial “Tolerana”.

1.5. Papel da galectina-1 nas infecções

As galectinas têm sido alvo de estudos em infecções causadas por diversos tipos de patógenos, dentre eles protozoários, vírus e fungos, devido, entre outras propriedades, sua atividade imunomoduladora.

Trichomonas vaginalis é um protozoário sexualmente transmissível, que infecta principalmente mulheres em idade reprodutiva, comumente associado com o aparecimento de outras doenças genitais (FICHOROVA, 2010). Estudos *in vitro* utilizando-se células epiteliais cervicais e vaginais, que são as células hospedeiras que mantêm a aderência, sobrevivência e replicação do parasita no trato genital, sugerem o envolvimento das galectinas-1 e 3 nessa infecção (OKUMURA; BAUM; JOHNSON, 2008; CHATTERJEE et al., 2015; FICHOROVA et al., 2016). Estudos em modelos animais identificaram que as células humanas epiteliais normais expressam galectinas-1 e 3 que são capazes de se ligar à uma lipofosfoglicana (LPG) presente na superfície desse parasita, atuando, dessa forma, como receptor para o protozoário *T. vaginalis* e contribuindo para a adesão e persistência do parasita na superfície de células epiteliais (OKUMURA; BAUM; JOHNSON, 2008; FICHOROVA et al., 2016). Além disso, foi visto que as galectinas secretadas pelas células epiteliais vaginais durante a infecção podem modular a resposta celular inflamatória (FICHOROVA, 2010).

Para *Toxoplasma gondii*, protozoário do filo Apicomplexa causador da toxoplasmose, estudos envolvendo galectina são predominadas por galectina-3, que

relatam sua participação no reconhecimento do parasita por macrófagos e nas funções efectoras de neutrófilos (ALVES et al., 2010, 2013; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010). A galectina-1 também pode estar envolvida na adesão do *T. gondii* à célula hospedeira, dando suporte ao processo de invasão, uma vez que foi observado que essa lectina é capaz de se ligar às âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) da superfície do parasita. Em nível celular, foi observado que a produção de TNF- α por macrófagos, induzida por *T. gondii*, depende da expressão de galectina-3 mas não de galectina-1 (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010).

Trypanosoma cruzi, parasita causador da Doença de Chagas, também tem sido investigado em modelos experimentais, onde um duplo papel imunorregulador da galectina-1 foi mostrado em diferentes concentrações desta proteína, gerando diferentes efeitos no controle da replicação do *T. cruzi*. Baixas concentrações de galectina-1 aumentam a replicação parasitária sem afetar a sobrevivência dos macrófagos e doses mais altas induzem a apoptose de tais células e inibem a replicação do parasita. Além disso, a galectina-1, na sua concentração mais baixa, conseguiu regular negativamente os mediadores críticos para a morte de parasitas, tais como IL-12 e óxido nítrico, enquanto não afetou a secreção de IL-10 (ZÚÑIGA et al., 2001). Outros estudos realizados para a avaliação do envolvimento da galectina-1 na infecção aguda experimental por *T. cruzi*, demonstraram que a ausência de galectina-1 endógena ou o tratamento dos animais com galectina-1 exógena desencadeiam resposta imunológica eficiente no combate à infecção (RIUL, 2010; 2014). Além disso, recentemente foi reportado que camundongos nocautes para galectina-1 infectados com *T. cruzi* são resistentes à infecção se comparados com o grupo selvagem (PONCINI et al., 2015). Animais nocautes apresentaram mortalidade reduzida e menor carga parasitária no tecido muscular. Esse efeito foi acompanhado por um aumento de células T CD8+ e maior número de células T CD4+ produtoras de IFN- γ . Sugere-se que esse fenótipo esteja associado à uma disfunção nas propriedades reguladoras devido à falta de gal-1, levando à exacerbação da resposta Th1 (PONCINI et al., 2015). Em contrapartida, foi também relatado que a galectina-1 endógena está relacionada à proteção contra a infecção por *T. cruzi*. A falta de galectina-1 endógena em modelos murinos leva a uma parasitemia aumentada, sinais reduzidos de inflamação nos tecidos do coração e do músculo esquelético e taxas de sobrevivência mais baixas em resposta à infecção intraperitoneal com *T. cruzi*. Um outro dado interessante é que a infecção por este parasita altera o glicofenótipo de

células cardíacas, reduzindo a ligação de gal-1 exógena à superfície celular (BENATAR et al., 2015).

Com relação à infecções virais, o papel da galectina-1 também tem sido explorado, mostrando que a expressão de galectina-1 endógena contribui para a resistência dos macrófagos à infecção *in vitro* com vírus da dengue (DENV-1) e é também importante para a suscetibilidade fisiológica dos camundongos à infecção *in vivo* com esse vírus, sugerindo que a galectina-1 possa desempenhar um potencial antiviral (TOLEDO et al., 2014). Além disso, foi visto que a galectina-1 aumenta a cinética de adsorção do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em macrófagos, o que facilita a infectividade do vírus ao encurtar o tempo necessário para estabelecer uma infecção. Galectina-1 também funcionaria como um receptor de absorção solúvel e aumentaria a captação do vírus HIV-1 por macrófagos (OUELLET et al., 2005; MERCIER et al., 2008).

Histoplasma capsulatum é um fungo dimórfico responsável pela doença pulmonar histoplasmose. Recentemente foi demonstrado que a deficiência de gal-1 promove o aumento da concentração de NO e de citocinas pró-inflamatórias, além do aumento de infiltrado neutrofílico no pulmão de camundongos infectados com *H. capsulatum*, se comparado ao grupo selvagem. Além disso, macrófagos destituídos de galectina-1 infectados com esse fungo exibiram elevados níveis de RNA mensageiro para prostaglandina E, sugerindo que a galectina-1 contribui para a resposta de fagócitos contra a infecção (RODRIGUES et al., 2016).

Modelos murinos destituídos do gene da galectina-1 representam uma ferramenta muito útil na investigação do papel da galectina-1 endógena em modelos de infecção (BENATAR et al., 2015; PONCINI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016). Além disso, a suplementação com galectina-1 recombinante exógena tem sido uma estratégia bastante estudada para utilização na terapêutica de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (SANTUCCI et al., 2000, 2003; BAUM et al., 2003; PERONE et al., 2006; TOSCANO et al., 2006; BENATAR et al., 2015; BLIDNER et al., 2015; PÉREZ et al., 2015). Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer o papel imunorregulador da galectina-1 em diferentes modelos experimentais, dentre eles os de infecção, visando a melhor compreensão dos mecanismos imunorregulatórios dessa lectina. Assim, com o intuito de esclarecer alguns destes mecanismos, nosso trabalho foi proposto e direcionado para o estudo do papel da

galectina-1 na resposta imunológica do hospedeiro na infecção experimental por *N. caninum*.

.....

Objetivos

.....

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da galectina-1 na modulação da resposta imune em modelo experimental de *Neospora caninum*, utilizando camundongos selvagens (WT^{gal-1+/+}) e destituídos do gene de galectina-1 (KO^{gal-1-/-}) e avaliar o efeito da galectina-1 sobre *N. caninum* em ensaios *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar:

- a capacidade de ligação da galectina-1 exógena com taquizoítas de *Neospora caninum*;
- os efeitos da interação da galectina-1 exógena com taquizoítas de *Neospora caninum* no processo invasivo *in vitro*;
- o papel da galectina-1 na progressão da infecção com *Neospora caninum* por meio da carga parasitária peritoneal;
- o efeito da galectina-1 na modulação do perfil fenotípico e funcional de leucócitos da cavidade peritoneal e do baço;
- o efeito da galectina-1 na modulação do perfil de secreção de citocinas por células esplênicas;
- o efeito da galectina-1 na modulação do perfil de anticorpos anti-*N. caninum* no soro.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

O Fluxograma da Figura 3 descreve, brevemente, a organização das atividades desenvolvidas durante a realização deste trabalho.

Figura 3. Fluxograma das atividades desenvolvidas. VERO: células renais de macaco verde africano (*Verda Reno*); ON: óxido nítrico; ELISA: ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); CPRG: ensaio de β -galactosidase (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo); i.p.: intraperitoneal; gal-1: galectina-1

A partir da infecção dos camundongos com taquizoítas de *Neospora caninum* e tratamento com galectina-1 (gal-1), as amostras sanguíneas, teciduais e/ou provenientes do lavado peritoneal, foram processadas e utilizadas nos respectivos experimentos. Em paralelo a estes ensaios *in vivo*, ensaios *in vitro* foram realizados com o intuito de avaliar os efeitos desta lectina sobre os taquizoítas de Nc.

3.2. Manutenção *in vitro* e purificação do parasita *Neospora caninum*

3.2.1. Cepas de *Neospora caninum*

Durante o desenvolvimento do trabalho, foram utilizados taquizoítas da cepa Nc1 (DUBEY et al., 1988) selvagem (Nc1-selvagem) e taquizoítas Nc1 que expressam β -galactosidase (Nc1-LacZ), produzidos em nosso laboratório através da transfecção com NcDHFR-CAT/NcTub-tetO/LacZ (PEREIRA; YATSUDA, 2014). Estes taquizoítas (Nc1-lacZ) constituem uma ferramenta útil em ensaios de detecção e quantificação do parasita. A escolha por trabalhar com Nc1-lacZ em ensaios *in vivo* se deve à maior virulência desta cepa observada em relação à Nc1 selvagem em cultivo em nosso laboratório, e também pela facilidade de detecção do parasita em ensaios de invasão por meio de metodologias simples.

3.2.2. Cultivo e preparo do parasita

Células VERO (células renais de macaco verde africano – *verda reno*) foram mantidas em garrafas de 25 cm² ou 75 cm² (Kasvi) em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina e canamicina (10 µg/ ml) (Gibco) a 37°C com 5% CO₂ até obtenção de confluência, a qual foi observada em microscópio invertido modelo DM IL (Leica). Taquizoítas de Nc1 selvagem e Nc1-lacZ foram inoculados em monocamadas de células VERO a 37°C com 5% CO₂ contendo 5% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco), e antibiótico canamicina (10 µg/ ml), ou cloranfenicol (20 uM), este último para o cultivo de Nc1-lacZ, por cerca de 7 dias, quando se completa um ciclo lítico. Os parasitas foram colhidos por raspagem das garrafas com auxílio de um *scraper* e o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo plástico de fundo cônico com volume de 50mL. Posteriormente, este conteúdo foi passado 10 vezes por uma agulha 25G para promover a lise das células íntegras e liberação dos taquizoítas intracelulares remanescentes. A suspensão de células foi centrifugada por 3 minutos a 1.000 xg sob

4°C e o *pellet* obtido foi ressuspensão em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e submetido à coluna PD10 (Sephadex G-25, GE Healthcare). O conteúdo eluído foi recolhido em alíquotas de 1mL, as quais foram centrifugadas (3300xg, 3 minutos, 4°C) e os *pellets* formados, contendo os taquizoítas, foram reunidos em um único microtubo de fundo cônico. Após ressuspensão em 1mL de PBS, os taquizoítas foram contados em câmara de Neubauer.

3.3. Obtenção e purificação de galectina-1 recombinante humana dimérica (gal-1)

A galectina-1 (gal-1) utilizada em nosso estudo foi gentilmente cedida pelo laboratório do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, nosso colaborador, onde foi produzida e purificada (DIAS-BARUFFI et al., 2003). Brevemente, culturas de bactérias *E. coli* (cepa M-15) transformadas com plasmídeo PQU-50 contendo o gene completo da gal-1 humana dimérica foram utilizadas como fonte dessas proteínas. Para a indução da expressão da gal-1, foi utilizado 1,5μm de isopropil β-D-tiogalacto-piranozídeo (IPTG, Sigma-Aldrich) por cerca de 4 horas. O sobrenadante bruto foi tratado com inibidores de proteases, lisozima, β-mercaptoetanol, RNase e DNase e, posteriormente, centrifugados (10.000 xg, 30 min, 4°C). A gal-1 foi purificada submetendo o sobrenadante da etapa de centrifugação à cromatografia de afinidade usando colunas com resina de agarose-lactose. As concentrações protéicas foram determinadas pelas absorbâncias das soluções em 280 nm e os valores convertidos em concentração (mg/mL) utilizando o coeficiente de extinção molar dessas moléculas.

Após as etapas de obtenção e purificação, as frações de gal-1 foram tratadas com iodocetamida para alquilação dos seus sítios oxidáveis com o intuito de aumentar sua estabilidade e manter sua capacidade lectínica (WHITNEY; POWELL; SANFORD, 1986). Após alquilação, a gal-1 foi novamente purificada em coluna de exclusão molar (PD-10, GE Healthcare) e os lipopolissacarídeos (LPS) residuais foram removidos em uma coluna de polimixina B. Finalmente, as alíquotas de gal-1 foram filtradas em membrana de 0,22 μm (Millipore) para esterilização e refrigeradas sob 4°C para posteriores ensaios.

3.4. Ensaios *in vitro*

3.4.1. Avaliação da capacidade de ligação da galectina-1 com taquizoítas de *N. caninum*

Os ensaios para avaliar a capacidade da gal-1 se ligar aos taquizoítas de *N. caninum* (*binding*) foram realizados utilizando gal-1 humana conjugada com FITC (gal-1^{FITC}), produzida no laboratório do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi e gentilmente cedida por ele.

O preparo da gal-1^{FITC} foi conduzido segundo procedimento descrito por Leppanen e colaboradores (2015). Brevemente, 1 mg de gal-1 recombinante humana foi incubada com 10µL de solução de FITC a 1mg/mL em PBS contendo 0,1 M de lactose por 1 hora em temperatura ambiente. Após período para conjugação, o FITC livre remanescente e a lactose foram removidos através de uma coluna PD-10 (GE Healthcare) equilibrada com PBS contendo 14mM de β-mercaptoetanol. Para separar a gal-1 funcionalmente ativa (conjugada) da proteína inativa, a gal-1 foi passada por uma pequena coluna de lactosil-agarose em PBS e, então, a gal-1 não marcada foi lavada com 5mL de PBS. Posteriormente, a gal-1 conjugada foi eluída com 0,1M de lactose em PBS. Previamente a cada experimento, a lactose foi removida utilizando-se de uma coluna PD-10 equilibrada com 14mM de β-mercaptoetanol (LEPPANEN, 2015).

3.4.1.1. Análise por Citometria de Fluxo

Para o ensaio de *binding* por citometria de fluxo, foram utilizadas três concentrações de gal-1^{FITC} em PBS (1µM, 4µM e 8µM) e diferentes açúcares como controles da reação: a lactose, que se liga de modo específico à região de reconhecimento de carboidrato (CRD), competindo com sítios de ligação do Nc, e, portanto, controle negativo do ensaio, e a sacarose, que não tem a propriedade de se ligar especificamente à CRD. A galectina-1 (concentração intermediária - 4µM) foi incubada com 20mM de lactose ou sacarose (concentração muito maior que a concentração da gal-1, considerada suficiente para saturar as CRD), por 20 minutos sob 4°C.

Taquizoítas de *N. caninum* (1x10⁶), em um volume de 100µL, foram pipetados em tubos de citometria e posteriormente 100µL de galectina-1 marcada com FITC (1µM, 4µM e 8µM) foram adicionadas ao tubo. Este sistema foi mantido em incubação a 4°C por 45 minutos para que ocorresse a ligação da gal-1 ao parasita e, posteriormente, foi

feita a centrifugação (8.000 rpm, 4 minutos, 4°C) e lavagem das células com PBS. Em seguida, foi feita a fixação com PBS/formol 2% por 20 minutos, prosseguiu-se com 2 lavagens com PBS e então, a amostra foi levada para leitura em citômetro de fluxo.

3.4.1.2. Análise por Microscopia Confocal

Taquizoítas (1×10^7 em PBS) de Nc1-selvagem e/ou Nc1-lacZ foram fixados com formaldeído 3,65% em PBS por 1 h a 25°C. Após 2 lavagens com PBS, estes taquizoítas foram incubados com 300 µL de uma solução de bloqueio contendo BSA 2% e 2mM de glicina em PBS por 18h (*overnight*) e lavados. Posteriormente, os parasitas foram incubados com 5 µM de gal-1^{FITC} em PBS perfazendo um volume final de 100 µL e este sistema foi mantido a 4°C por 45 minutos para que ocorresse a ligação da gal-1 ao parasita. Após centrifugação (8.000 rpm, 4 minutos, 4°C) e lavagem das células com PBS, os taquizoítas foram ressuspensos em 30 µL de PBS e colocados na lâmina revestida com polilisina. Passados 30 minutos sob a proteção de luz, temperatura ambiente e câmara úmida, para que ocorresse a adesão dos parasitas na lâmina, foi feita a marcação com 1 µg/µL de iodeto de propídeo (PI - Santa Cruz Biotechnology), o qual absorve radiação a 488 nm e emite a 570 nm, exibindo coloração vermelha e, em seguida, a amostra foi levada à leitura em microscópio confocal (SP8 Laser Scanning Confocal Microscope, Leica), conectado a uma câmera digital, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-USP. As imagens foram capturadas e processadas pelo programa LAS AF version 3.2.0.9652.

3.4.2. Avaliação da ação da galectina-1 sobre a invasão de *N. caninum* em células VERO

3.4.2.1. Incubação do parasita com a galectina-1

Para a avaliação dos efeitos da galectina-1 sobre o processo de invasão, Nc1-lacZ (1×10^6 células) foram incubados, em microtubos de plástico, com diferentes concentrações de galectina recombinante humana dimérica (50, 5, 0,5 e 0,05 µg/ml) diluída em PBS por 1 hora, sob agitação, em um termomixer (Eppendorf) a 37°C, em um volume final de 1 mL para permitir que ocorresse a ligação da galectina ao parasita. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (Sorvall fresco - Thermo Electron Corporation) a 250 xg, sob 4°C, por 10 minutos, lavadas duas vezes com PBS

e ressuspensas em 500 µl de PBS. Estes parasitas, previamente incubados com galectina-1, foram usados nos ensaios de invasão em diferentes modelos celulares.

3.4.3. Ensaio de invasão

A capacidade invasiva dos taquizoítas de *N. caninum* foi avaliada sobre células VERO, macrófagos e esplenócitos. O ensaio de invasão em células VERO foi realizado em monocamadas de células em placas de 24 poços (TPP). As células foram distribuídas nos poços 2 dias antes do experimento para a obtenção de 80% de confluência. Taquizoítas Nc1-lacZ (1×10^6 /poço) recém purificados, foram então incubados por 2 horas a 37°C, 5% CO₂. Após período de incubação, procedeu-se à lavagem com PBS. Para quantificar a taxa de invasão dos taquizoítas, determinou-se a atividade enzimática da β-galactosidase, a qual é proporcional à quantidade de taquizoítas, conforme descrito a seguir.

3.4.4. Detecção do parasita por ensaio enzimático (CPRG)

Passado o tempo de incubação, o sobrenadante contido em cada poço foi aspirado com o auxílio de uma micropipeta e desprezado. Os poços foram então lavados duas vezes com PBS. Posteriormente, 500 µL de tampão de lise (100 mM Hepes pH 8 (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico); 5 mM MgSO₄.7H₂O; 1% Triton X-100; 30 mg DTT; 0,5% SDS) foi adicionado aos poços da placa e incubados por 1h sob 50°C e agitação a 125 rpm para que ocorresse a lise do conteúdo celular aderido à placa e consequente recuperação dos taquizoítas intracelulares. A quantificação do parasita foi realizada a partir de uma reação enzimática. Como o Nc1-lacZ é capaz de expressar a enzima β-galactosidase de forma estável, é possível mensurar, indiretamente, a quantidade de parasitas que invadiram as células, uma vez que esta enzima tem a capacidade de hidrolisar o CPRG (clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo), molécula análoga à lactose, adicionado à reação, dando origem a um produto de coloração vermelha que pode ser lido a 570nm. Assim, a absorbância se correlaciona diretamente com a quantidade de taquizoítas no meio. Para isso, 1×10^5 de células provenientes da cavidade peritoneal dos animais foram colocadas em um microtubo de plástico com 500µL de tampão de lise (100 mM Hepes pH 8 (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico); 5 mM MgSO₄.7H₂O; 1% Triton X-100; 30 mg DTT; 0,5% SDS) e incubadas por 1h sob 50°C e agitação a 125 rpm para permitir a lise das células e consequente liberação dos taquizoítas para o meio extracelular. Após este período,

o conteúdo do poço foi transferido para um microtubo de plástico de fundo cônico e centrifugado a 250 xg sob 4°C por 10 minutos. Em uma placa de 96 poços foram pipetados 50 µL do sobrenadante da amostra e 200µL de 5mM CPRG (Roche) em tampão de lise contendo Triton X-100 1%. Após incubação por 12 a 18h sob 37°C, a absorbância foi avaliada num leitor de ELISA (Power Wave - Biotek) a 570 nm.

3.4.5. Avaliação da proliferação de *N. caninum* em células esplênicas

3.4.5.1. Cultura de células esplênicas e inoculação do parasita

As células esplênicas utilizadas no ensaios de proliferação *in vitro* foram obtidas de camundongos machos C57BL/6, conforme procedimento descrito adiante no item 3.5.8. Da suspensão de células esplênicas obtida, 1×10^6 células (volume final de 500µL) por poço foram transferidas para uma placa de 24 poços (Costar) e mantidas em RPMI 1640, suplementado com 5% de SFB, 2mM de glutamina e canamicina (10 µg/ ml). Após obtenção de confluência, inoculou-se 1×10^4 Nc1-lacZ por poço, perfazendo um volume final de reação de 1mL.

Com o objetivo de determinar o tempo de incubação necessário para ocorresse uma proliferação significativa do parasita, a cada tempo (0h, 1h, 2h, 4h, 18h, 24h e 72h) o conteúdo de um poço da placa foi processado e empregado em análises posteriores: ensaio enzimático (segundo o item 2.4.4) e citometria de fluxo.

3.4.5.2. Detecção do parasita por Citometria de Fluxo

Para a quantificação da invasão de esplenócitos por Nc1-lacZ, pela técnica de citometria de fluxo, anticorpo anti-βgal foi utilizado para a marcação dos taquizoítas. Após a lise do conteúdo celular aderido à placa e transferência do conteúdo dos poços para tubos de citometria, realizou-se a centrifugação (250xg, 5 minutos, 4°C) e lavagem das células com PBS. Estas células foram então fixadas (formaldeído 2% por 20 minutos a 4°C) e permeabilizadas (solução contendo saponina 0,5% por 20 minutos). Prosseguiu-se, então, com a marcação das células com anticorpo anti-βgal marcado com Alexa 647 por 30 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz. O resultado foi apresentado em porcentagem de células com alta fluorescência na população total. As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de

Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo/USP, no citômetro FACS-Canto I (BD Biosciences) e os resultados foram fornecidos através do programa FACSDiva (BD).

3.4.6. Avaliação da proliferação de *N. caninum* em macrófagos

Macrófagos de duas linhagens, murinos (cepa J774 – ATCC) e/ou humanos (U937 – ATCC), foram obtidos comercialmente e cultivados em garrafas de cultura de 75cm² em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (5%), glutamina (2mM), e penicilina/estreptomicina (50 U ou µg/ ml) a 37°C com 5% CO₂. Foi então, feita a raspagem do fundo da garrafa com a utilização de um *cell scraper* para a transferência destes macrófagos para a placa de 24 poços, onde foi realizado o ensaio de proliferação. Foram plaqueadas 1x10⁶ células/poço as quais foram mantidas em cultura, sob as mesmas condições anteriores, até obtenção de confluência.

Para investigação da capacidade de *Nc* invadir e se proliferar no interior de macrófagos, três concentrações diferentes do parasita em um volume final de reação de 1mL foram incubados com os macrófagos em cultura: 1x10⁴, 5x10³ e 1x10³ taquizoítas de *Nc1-lacZ*. O período de incubação foi de 72h, após o qual procedeu-se a quantificação do parasita por reação enzimática (CPRG), conforme descrito no item 3.4.4.

3.5. Ensaio *in vivo*

Os protocolos experimentais contidos neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética local (protocolo 11.1.1279.53.2 – Anexo I). Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

3.5.1. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos machos, com 6 a 8 semanas, da linhagem C57BL/6 selvagem (*wild type* - WT^{gal-1+/+}), e camundongos C57BL/6 destituídos do gene *gal-1* (*knockout* - KO^{gal-1-/-}). Os camundongos KO^{gal-1-/-} foram cedidos pelo Prof. Dr. Richard D. Cummings, do Departamento de Bioquímica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Emory, Atlanta, Georgia - EUA e atualmente estão sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi da FCFRP-USP. Os animais selvagens foram adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade de São Paulo – *campus* Ribeirão Preto, já os camundongos nocautes foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Os

animais foram mantidos em caixas apropriadas (1124 cm²), em um número de 5 camundongos por caixa.

3.5.2. Infecção de camundongos por *N. caninum* e tratamento com gal-1

Os camundongos dos grupos infectados (6 a 8 semanas de idade) foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 5×10^7 taquizoítas de Nc1-lacZ. Para a infecção, os parasitas foram obtidos e purificados de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.2, suspensos em um volume de 500 µL de PBS, e inoculados no animal, utilizando-se de uma seringa com agulha 25G (BD).

O tratamento dos animais com gal-1 (30 µg/animal – 200 µl de PBS estéril) ou PBS (controle) foi realizado diariamente do 1º ao 7º dia de infecção por via intraperitoneal, conforme procedimento descrito por Santucci e colaboradores (2003). Nos dias 5, 8 e 15 após a infecção, os animais foram submetidos à eutanásia, conforme descrito no próximo item. Os grupos experimentais estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais e delineamento experimental

Dias do experimento	0	1 a 7 dias	5, 8 e 15 dias		
Grupos 3 animais (WT e KO) / dia eutanásia	Infecção (5×10^7 Nc1-lacZ)	Tratamento com gal-1 (30 µg/dia)	Lavado peritoneal*	Coleta de órgãos e soro*	Obtenção de células do baço*
Controle (C)	-	PBS	+	+	+
Controle tratado (CT)	-	+	+	+	+
Infectado (I)	+	PBS	+	+	+
Infectado tratado (IT)	+	+	+	+	+

Gal-1: galectina-1; Nc: *Neospora caninum*

* Com o conteúdo do lavado peritoneal foram realizados ensaios para quantificação da carga parasitária, produção de óxido nítrico e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Com os órgãos coletados foram realizadas análise do parasitismo tecidual. Com as células do baço foi realizada a cultura de esplenócitos para o ensaio de secreção de citocinas, imunofenotipagem e marcação de citocinas intracelulares por citometria de fluxo. O soro foi utilizado para a quantificação de anticorpos.

3.5.3. Eutanásia dos animais

Após os períodos de infecção pré-estabelecidos (5, 8 e 15 dias), os animais foram submetidos à anestesia com quetamina/xilazina (100mg/10mg/kg) para a realização do lavado peritoneal, sacrificados por exsanguinação e posteriormente foi realizada a retirada dos órgãos (baço, cérebro e coração). As células do lavado peritoneal (procedimento descrito a seguir) foram utilizadas para os ensaios de produção de óxido nítrico, quantificação do parasita por CPRG e ensaios de imunofenotipagem. O baço foi macerado, conforme descrito adiante, e suas células utilizadas para os ensaios de secreção de citocinas, imunofenotipagem e marcação de citocinas intracelulares. Além destes ensaios, foram obtidos dados de peso do baço, contagem do número total de células do baço (esplenócitos) e contagem do número de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal. Os demais órgãos foram armazenados para os ensaios de quantificação do parasita por PCR (dados não mostrados).

3.5.4. Obtenção dos macrófagos peritoneais murinos

Após eutanásia, os animais foram mantidos em capela de fluxo laminar e fixados em decúbito dorsal em suporte para dissecação. Para a obtenção dos macrófagos peritoneais, a parede abdominal foi exposta após divulsão da pele e foram introduzidos 5mL de PBS estéril na cavidade peritoneal. Após massagem abdominal, o conteúdo de PBS contendo as células peritoneais foi aspirado com auxílio de seringa e mantidos no gelo. As células foram então transferidas para tubo cônico de plástico de 15 mL e centrifugadas a 2.500 rpm por 5 minutos sob 4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI completo para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer através da coloração com Azul de Tripán (0,4%). Estas células foram utilizadas para os ensaios de quantificação dos parasitas intraperitoneais por CPRG, detecção dos parasitas intraperitoneais por precipitação de X-Gal, produção de óxido nítrico (NO), e ensaios de imunofenotipagem.

3.5.5. Detecção dos parasitas Nc1-lacZ intraperitoneais por precipitação de X-Gal

As células provenientes da cavidade peritoneal (1×10^5) de animais infectados foram fixadas com formaldeído 2% em PBS, lavadas com PBS e centrifugadas a 2.000 xg por 3 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 200µL de solução de detecção de β -galactosidase composta por X-Gal, ferrocianido e ferricianido de potássio (kit comercial β -gal staining set, Roche) e incubados por 3 horas a 37°C. A suspensão de células

contendo os taquizoítas foi lavada três vezes com PBS, ressuspensos em glicerol 60%, transferidos para uma lâmina e cobertos com lamínula. A solução de detecção precipita na forma de sal de coloração azul, pela ação da β -galactosidase, possibilitando a visualização dos parasitas corados em azul.

3.5.6. Quantificação dos parasitas intraperitoneais por CPRG

As células (1×10^6) provenientes da cavidade peritoneal dos animais foram lisadas e procedeu-se à quantificação parasitas através da reação enzimática conforme foi descrito no item 2.4.4.

3.5.7. Quantificação de óxido nítrico (ON) produzido por células do lavado peritoneal

A produção de óxido nítrico por células provenientes do lavado da cavidade peritoneal foi mensurada indiretamente através da quantificação de nitrito (NO_2^-), um produto de degradação mais estável, pelo método de Griess (GREEN et al, 1982). Uma alíquota de 100 μL (4×10^5 células) da suspensão de células foi distribuída em placa de 96 poços e as células foram estimuladas com extrato total de Nc ou forbol miristato acetato (PMA) (20 ng/mL). A placa foi levada à estufa com 5% de CO_2 , por 48 h sob 37°C . Após este período de incubação, a placa foi centrifugada em 1.800 rpm por 6 minutos e 100 μL do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços limpa e seca. Foi adicionado 100 μL de reagente de Griess (50 μL de sulfanamida 1% e 50 μL de N-naftil-etilenodiamina diluídos em solução de ácido fosfórico 5%) ao sobrenadante e, posteriormente, a placa foi levada para leitura da absorbância da reação em leitor de microplacas, com filtro de 540 nm. As concentrações de nitrito foram obtidas extrapolando-se de uma curva padrão de nitrito de sódio construída com concentrações decrescentes de 200 μM a 6 μM .

3.5.8. Obtenção das células esplênicas murinas

Para a colheita das células esplênicas, o baço foi removido do animal em condições assépticas, em capela de fluxo laminar horizontal (Class II BSC Airstream, ESCO), e mantido em PBS estéril. Os esplenócitos foram obtidos através da maceração dos baços de camundongos C57BL/6. Resumidamente, com o auxílio de pinças e tesoura e apoio em placas de petri, o tecido conjuntivo foi separado do baço. A maceração foi feita utilizando-se de um êmbolo de seringa de procedimento laboratorial

e pela passagem destas células por uma peneira de 70µm (cell strainer BD) apoiada em tubo de plástico com fundo cônico (50mL), seguida da lavagem do excesso de material retido na peneira com PBS. Após centrifugação a 250 xg sob 4°C por 10 minutos, o *pellet* formado foi ressuspenso em tampão ACK (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 1mM, Na₂EDTA 0,1 mM - *Ammonium-Chloride-Potassium Lysing buffer* BD) e incubado por 2 minutos em temperatura ambiente para que ocorresse a lise das hemácias. As células foram então lavadas 2 vezes em solução salina balanceada de Hank (HBSS – NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂.6H₂O, MgSO₄.7H₂O, Na₂HPO₄, KH₂HPO₄, glicose, NaHCO₃) e centrifugadas a 250 xg sob 4°C por 10 minutos. Após centrifugação, as células foram coradas com Azul de Tripán 0,4%, contadas em câmara de Neubauer e então, foram feitas as diluições destas células, em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal, a uma concentração favorável ao experimento. Estas células foram utilizadas nos ensaios de imunofenotipagem, de secreção de citocinas e também, como já descrito, no ensaio de invasão *in vitro*.

3.5.9. Extratos totais de *N. caninum*

Os extratos totais de *N. caninum* foram obtidos através da sonicação de formas taquizoítas do parasita em tampão ureia 8M. Após purificação dos taquizoítas, sonicação e centrifugação (10.000 rpm, 5 minutos), o sobrenadante foi utilizado para estímulo das células provenientes do baço para o ensaio de secreção de citocinas e para a sensibilização de placas para ensaio imunoenzimático (quantificação de anticorpos).

3.5.10. Ensaio de secreção de citocinas

Para o estudo dos efeitos da infecção com *N. caninum* sobre a secreção de citocinas pelos linfócitos, a suspensão de células esplênicas foi distribuída em placas de 24 poços (4x10⁵ células por poço - volume final de 100µL) e, na presença ou não de estímulos, foram incubadas por 72 horas a 37°C em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂. Os estímulos de secreção utilizados foram o extrato total de *N. caninum* (10⁴ taquizoítas/poço) ou concanavalina A (Con-A) a 2 µg/mL. Os sobrenadantes foram então colhidos, centrifugados (250 g por 10 minutos), filtrados em membrana de poro 0,22 µm (Millipore) e estocados a -70°C até o uso para dosagem de citocinas (IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-6).

3.5.10.1. Dosagem de citocinas por ELISA

A quantificação de citocinas no sobrenadante de células esplênicas cultivadas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit comercial OptEIATM SET:Mouse (BD Biosciences).

As microplacas de poliestireno de 96 poços para ELISA (Costar) foram sensibilizadas pela adsorção de 50 µL/poço de anticorpo de captura da respectiva citocina pesquisada, diluído (1/250) em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,5, e incubadas overnight (12 a 18 horas) a 4°C. Posteriormente as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) (Sigma-Aldrich) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, com uma solução de PBS acrescida de 10% de soro bovino fetal, para que houvesse o bloqueio de sítios inespecíficos que possam ser reconhecidos pelo anticorpo, evitando, assim, resultado falso positivo. Após esse período, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e foram adicionados aos poços, em duplicata, 100µL de cada citocina recombinante estudada, em várias diluições, para obtenção de uma curva padrão ou 100µL das amostras de sobrenadantes provenientes do ensaio de secreção de citocinas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e lavadas 5 vezes com PBS-T. Após as lavagens, o anticorpo biotinilado específico para a citocina testada (anticorpo de detecção) mais a estreptavidina conjugada à peroxidase (reagente enzimático), foram adicionados à reação e incubados por 1 hora. Após nova etapa de lavagens, foi acrescentada a solução reveladora, constituída de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (TMB substrate reagente set, BD). A reação foi bloqueada após 20 minutos com ácido fosfórico 1 M e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave - Biotek). A concentração das diferentes citocinas nos sobrenadantes das culturas de células foi determinada com referência à curva padrão obtida com as diferentes diluições da citocina recombinante.

3.5.11. Dosagem de anticorpos específicos para *N. caninum* por ELISA

Para a dosagem de IgG e IgM, foram utilizadas placas de 96 poços (Kasvi), utilizando-se como antígeno extrato total de Nc1 (conforme descrito no item 3.5.9) em concentração correspondente a cerca de 1×10^4 taquizoítas por poço, diluídos em 100µl do tampão de sensibilização (0,06M Na₂CO₃). A placa foi incubada por 18 horas à temperatura ambiente para sensibilização. Após este período, os poços foram lavados manualmente três vezes com PBS-T (PBS, 0,5% de Tween 20

(polyoxyethylene sorbitan monolaurate - USB Corporation)) e bloqueados com 100µl/poço de PBS-GT (PBS, 0,5% de Tween 20 e 0,1% de gelatina suína - Sigma-Aldrich). Os soros foram analisados em triplicatas, diluídos em PBS-T-G (1:500) e incubados por uma hora a 37°C, sendo em seguida realizada a lavagem dos poços por três vezes com PBS-T. Foram utilizados anticorpos de origem caprina específicos contra IgG (Millipore) e IgM (Invitrogen) conjugados com peroxidase. Cada poço recebeu 100 µl da diluição de conjugado em PBS-GT, seguindo-se incubação por uma hora a 37°C, e nova etapa de lavagem dos poços com PBS-T. Para mensuração da ligação antígeno-anticorpo foram utilizados 100 µl de solução de TMB (BD), por 15 minutos, à temperatura ambiente, sob isolamento luminoso. A reação foi inibida pela adição de 50 µl de ácido fosfórico 1M, e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave - Biotek). Os resultados foram apresentados em absorbância a 450nm, e a análise foi feita de maneira comparativa entre os grupos estudados.

3.5.12. Análise imunofenotípica das populações celulares por citometria de fluxo

As células esplênicas dos diferentes grupos de animais foram submetidas à análise de marcadores de superfície para caracterização fenotípica dos linfócitos (CD3, CD4, CD8, CD19) e para caracterização funcional destas células (MHCII, CD80, CD86). Para as células provenientes do lavado peritoneal, os marcadores de superfície analisados foram F4/80, CD11c e Ly6G-Gr1 para caracterização celular (macrófagos, células dendríticas e granulócitos, respectivamente) e expressão dos marcadores TLR2, MHCII, CD80 e CD86 para caracterização funcional destas células. A tabela 2 lista os anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica das células, bem como seus respectivos marcadores celulares analisados.

Tabela 2: Marcadores celulares e respectivos anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais	Marcadores celulares	Descrição no ensaio
-------------------------------	-----------------------------	----------------------------

Anti-CD4^{FITC} Invitrogen	CD4	Marcador de superfície celular de subpopulação de linfócitos T
Anti-CD8a^{APC} Biolegend	CD8	Marcador de superfície celular de subpopulação de linfócitos T
Anti-CD19^{PE} Biolegend	CD19	Marcador de superfície celular da população de linfócitos B
Anti-F4/80^{APC} Invitrogen	F4/80	Marcador de superfície celular de macrófagos murinos
Anti-CD11c^{PE} BD Pharmingen	CD11c	Marcador de superfície celular de células dendríticas
Anti-Ly6G/Gr1^{FITC} Life technologies	Ly6G/Gr-1	Marcador de superfície celular de granulócitos
Anti-CD80^{FITC} BD Pharmingen	CD80	Marcador de superfície celular para moléculas coestimulatórias em APCs
Anti-CD86^{APC} BD Pharmingen	CD86	Marcador de superfície celular para moléculas coestimulatórias em APCs
Anti-CD40^{APC} BD Pharmingen	CD40	Marcador de superfície celular para moléculas coestimulatórias em cél B
Anti-TLR2^{FITC} R&D Systems	Toll Like Receptor 2	Marcador de superfície para receptor tipo Toll 2 em APCs
Anti-I-A/I-E^{FITC} BD Pharmingen	MHCII	Marcador de ativação celular
Anti-INF-γ^{PE} Invitrogen	Citocina INF- γ	Marcador de citocina intracelular INF- γ
Anti-IL10^{PE} BD Pharmingen	Citocina IL-10	Marcador de citocina intracelular IL-10
Anti-IL-17A^{PE} BD Pharmingen	Citocina IL-17	Marcador de citocina intracelular IL-17
Anti-CD3ϵ^{PE} Biolegend	CD3	Marcador de superfície celular de linfócitos
Anti-CD25^{APC} Biolegend	CD25	Marcador de superfície celular para identificação de células Treg
Anti-FoxP3^{PE} Biolegend	FoxP3	Marcador de fator de transcrição FoxP3 para identificação de Treg

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; APC: alofocianina APCs: células apresentadoras de antígenos; Treg: célula T regulatória.

Células esplênicas (2×10^6) ou do lavado peritoneal (1×10^6) diluídas em 100 μ L de PBS foram transferidas para tubos de poliestireno com capacidade de 5 mL (FACS - BD) e incubadas com 0,25 μ g de anticorpo anti-CD16/CD32 comercial (FcBlock - BD Pharmingen) por 15 minutos sob 4°C para bloqueio dos receptores Fc γ .

Posteriormente, as células (1×10^6) foram incubadas com $0,25 \mu\text{g}$ dos respectivos anticorpos por um período de 30 minutos, sob 4°C e protegido da luminosidade. Após marcação, as células foram lavadas (centrifugação a 250G por 5 minutos) com tampão de lavagem (PBS/0,1% azida sódica/0,5%BSA) e fixadas em paraformaldeído a 2% por 20 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em tampão de lavagem e levadas à leitura em um período de até 12 horas após marcação. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACS-Canto I (BD Biosciences) e os resultados foram fornecidos através do programa FACSDiva (BD).

Os resultados foram expressos em mediana da intensidade de fluorescência por célula em escala logarítmica e como porcentagem de células fluorescentes na população total. Para os marcadores de superfície relacionados à caracterização fenotípica das células, os valores foram demonstrados em porcentagem de células positivas, e para os marcadores de caracterização funcional destas células, em mediana de intensidade de fluorescência.

Os citogramas e histogramas apresentados (Figuras 4 e 5) ilustram as estratégias de aquisição das células e as análises fenotípicas realizadas. O citograma bidirecional permitiu distinguir e selecionar a população de células analisada (Figuras 4A e 5A).

Figura 4. Citogramas e histogramas de fluorescência representativos dos ensaios de imunofenotipagem da população de linfócitos. **A:** Citograma bidirecional indicando a população de linfócitos analisada contida na área P1, separação das células pela complexidade (eixo vertical) e tamanho (eixo horizontal). **B:** anticorpos controle isotípico marcados com FITC e APC (fluorescência inespecífica); **C:** anticorpo controle isotípico marcado com PE (fluorescência inespecífica); ambos utilizados para calibração do aparelho. **D:** anticorpos anti-CD4 marcado com FITC e anti-CD8 marcado com APC, gráfico em *dot plot* representativo de dupla marcação de células (subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺). **E:** anticorpo anti-CD19 marcado com PE, histograma de intensidade de fluorescência representativo de uma subpopulação de linfócitos (CD19⁺, linfócito B). **F:** anticorpos anti-CD8 marcado com APC e anti-IFN- γ marcado com PE; gráficos em *dot plots* representativos dos ensaios de expressão de citocinas intracelulares, a saber, IFN- γ e IL-10.

Figura 5. Citogramas representativos dos ensaios de imunofenotipagem da população de leucócitos não-linfócitos. A: Citograma bidirecional indicando a população de leucócitos não-linfócitos analisada contida na área P1, separação das células pela complexidade (eixo vertical) e tamanho (eixo horizontal). **B:** anticorpos anti-F4/80 marcado com APC e anti-Grl (Ly6G) marcado com FITC, gráfico em *dot plot* representativo de dupla marcação de células, subpopulações de macrófagos (F4/80⁺) e granulócitos (Ly6G⁺).

3.5.13. Análise da expressão de citocinas intracelulares em células esplênicas

A análise da expressão de citocinas intracelulares em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ também foi realizada por citometria de fluxo, na qual foram selecionadas as populações de células CD4⁺ ou CD8⁺ e, em seguida, foi determinada a expressão de IFN- γ e IL-10. Essa marcação de citocinas intracelulares foi realizada como descrito por Jankovic e colaboradores (JANKOVIC et al., 2007).

Resumidamente, células do baço (2x10⁶ cells/mL) foram distribuídas em placas de 96 poços com fundo em “U”, estimuladas com PMA (20ng/mL) e ionomicina (500ng/mL) e incubadas por um período de 4h em estufa a 37°C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Após estímulo, foram adicionados 10 μ g/ml de brefeldina (Sigma-Aldrich), com o intuito de cessar a secreção de citocinas e estas se concentrarem no Complexo de Golgi, facilitando a leitura. Tanto a incubação das células quanto a diluição das soluções foram feitas em meio RPMI completo. A placa foi novamente incubada por mais 2h em estufa a 37°C e, após esse período, as células foram centrifugadas (250 xg por 5 minutos), lavadas com tampão de lavagem (PBS / 0,1% azida sódica / 0,5%BSA), ressuspensas e transferidas para tubos de citometria de fluxo.

Adicionou-se às células 0,25 µg de anticorpo anti-CD16/CD32 comercial (FcBlock - BD Pharmingen) para bloqueio dos receptores Fcγ, por 15 min a 4°C. Posteriormente, as células foram marcadas com 0,5 µg (0,25 µg/10⁶ células) de anticorpo anti-CD4 e anti-CD8 (BD Biosciences). Em seguida, as mesmas foram fixadas com 500 µL de paraformaldeído a 2% por 20 minutos a temperatura ambiente e permeabilizadas com tampão contendo saponina 0,5% por 20 minutos sob 4°C. Em seguida, foram realizadas as marcações das citocinas intracelulares IFN-γ e IL-10 com os respectivos anticorpos, por 30 minutos no escuro. Após lavagens com tampão de permeabilização, as células foram ressuspensas em PBS/0,1% azida sódica/0,5%BSA e levadas à leitura no citômetro de fluxo. As amostras foram analisadas em citômetro BD FACS-Canto (BD Biosciences) e os resultados foram fornecidos através do programa FACSDiva (BD). Os citogramas bidirecionais permitiram distinguir e selecionar a população de células analisada, como mostrado pela Figura 4A, e analisar a expressão das citocinas em subpopulações celulares (Figura 4F).

3.6. Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prisma (*GraphPad Prism 5*) versão 5.01. Para analisar as diferenças entre os grupos experimentais com diferentes tratamentos (por exemplo: C, CT, I e IT), foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de *Tukey* (quando comparados mais de dois grupos). Para as comparações individuais, foi utilizado o teste t de *Student* (para dois grupos) para amostras não pareadas. Os resultados referentes ao estudo *in vivo* foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) com nível de significância para $p < 0,05$.

3.7. Principais equipamentos utilizados

- Balança Analítica modelo AS 2000C, Marte.
- Banho-maria de 5 litros - modelo 102, Fanem.
- Cabine de fluxo laminar horizontal Class II BSC Airstream, ESCO.
- Cabine de fluxo laminar horizontal Class II, Pachane.
- Centrífuga Refrigerada modelo fresco - Thermo Electron Corporation, Sorevall.
- Centrífuga Refrigerada modelo legend mach 1.6R, Sorevall.
- Citômetro de fluxo FACSCanto I, BD.

- Estufa incubadora de CO₂ modelo Forced-Air Elite II, Revco.
- Fotodocumentador Bio-Rad - Modelo Universal HoodII - Bio-Rad Laboratories.
- Freezer -70°C, Revco.
- Incubadora de bancada modelo CT-712, Cientec.
- Leitor de microplacas de ELISA modelo Power Wave, Biotek.
- Medidor de pH modelo AR25, Fischer Scientific
- Microscópio confocal modelo SP8 Laser Scanning Confocal Microscope, Leica.
- Microscópio invertido modelo DM IL, Leica.
- Microscópio Óptico modelo DME, Leica.
- Termociclador - Mastercycler Gradient, Eppendorf.
- Termomixer comfort, Eppendorf.

3.8. Principais reagentes comerciais utilizados

- Azul de Tripán - Sigma-Aldrich
- Brefeldina - Sigma-Aldrich
- BSA (albumina de soro bovino) - Sigma-Aldrich
- Canamicina – Gibco
- Cytotfix/Cytoperm: solução de fixação e permeabilização celular - BD
- Cloranfenicol - MP Biomedicals
- Cloridrato de Cetamina - Ketamina Agener União
- Concanavalina A - Sigma-Aldrich
- CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo) - Roche
- Ionomicina - Sigma-Aldrich
- PMA (phorbol-12-miristato-13-acetato) - Sigma-Aldrich
- Kit GoTaq® Green Master Mix - Promega
- Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega
- RPMI 1640 - Sigma-Aldrich
- SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sódio) - Amresco
- SFB (soro fetal bovino) – Gibco
- Tripsina - Sigma-Aldrich
- Triton-X 100 - USB Corporation
- Tween 20 - USB Corporation
- X-Gal - Promega
- Xilazina - Calmium Agener União

3.9. Anticorpos utilizados para a Citometria de Fluxo:

- Anti-CD16/CD32 - IgG2b de rato, clone 2.4G2 (Fc Block) - BD Pharmingen
- Controle isotípico IgG2a de rato marcado com alofococianina (APC), clone R35-95 - BD Pharmingen
- Controle isotípico IgG2a de rato marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), clone R35-95 - BD Pharmingen
- Controle isotípico IgG1 de hamster marcado com ficoeritrina (PE), clone G235-2356 - BD Pharmingen
- Controle isotípico IgG2b de rato marcado com Alexa Fluor 647, clone A95-1 - BD Pharmingen
- Anti-CD4^{FITC} - IgG2a de rato, clone RM4-5 - Invitrogen
- Anti-CD8 α ^{APC} - IgG2b de rato, clone 5H10 - Biolegend
- Anti-CD19^{PE} - IgG2a de rato, clone 6D5 - Biolegend
- Anti-F4/80^{APC} - IgG2a de rato, clone BM8 - Invitrogen
- Anti-CD11c^{PE} - IgG1 de hamster, clone HL3 - BD Pharmingen
- Anti-Ly6G^{FITC} - IgG2b de rato, clone RB6-8C5 - Thermo Scientific
- Anti-CD80^{FITC} - IgG2 de hamster, clone 16-10A1 - BD Pharmingen
- Anti-CD86^{APC} - IgG2a de rato, clone GL1 - BD Pharmingen
- Anti-CD40^{APC} - IgG2a de rato, clone 3/23 - BD Pharmingen
- Anti-TLR2^{FITC} - IgG2b de rato, clone 203325 - R&D Systems
- Anti-I-A/I-E^{FITC} - IgG2a de rato, clone 2G9 - BD Pharmingen
- Anti-INF- γ ^{PE} - IgG1 de rato, clone XMG1.2 - Invitrogen
- Anti-IL10^{PE} - IgG2b de rato, clone JES5-16E3 - BD Pharmingen
- Anti-IL-17A^{PE} - IgG1 de rato, clone TC11-18H10 - BD Pharmingen
- Anti-CD3 ϵ ^{PE} - IgG de hamster, clone 145-2C11 - Biolegend
- Anti-CD25^{APC} - IgG1 de rato, clone PC61 - Biolegend
- Anti-FoxP3^{PE} - IgG1 de camundongo, clone 150D – Biolegend
- Anti- β gal^{Alexa 647} - IgG2b de rato, clone 390 - BD Pharmingen

3.10. Principais soluções utilizadas

❖ Solução salina balanceada de Hank (HBSS)

Cloreto de sódio (NaCl)	8g
Cloreto de potássio (KCl)	0,4g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,139g

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1g
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)	0,048g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	0,06g
Glicose	1,0g
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	0,35g
Água Mili-Q q.s.p.	1000mL
Ajustar o pH final para 7,2 - 7,4. Filtrar.	

❖ Solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10x

Cloreto de sódio (NaCl)	80g
Cloreto de potássio (KCl)	2,0g
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)	11,5g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	2,0g
Água Mili-Q q.s.p.	1000mL
Ajustar o pH final para 7,2 - 7,4. Filtrar.	

❖ Solução de lise de eritrócitos (*lysing buffer* - ACK)

Cloreto de amônio (NH_4Cl)	8,29g
Bicarbonato de potássio (KHCO_3)	1,0g
Na_2EDTA	0,037g
Água Mili-Q q.s.p.	1000mL
Ajustar o pH final para 7,2 - 7,4. Filtrar.	

❖ Tampão de lavagem - FACS (PBS/BSA/azida sódica)

Albumina de soro bovina (BSA)	0,5%
Azida sódica (NaN_3)	0,1%
PBS 1x q.s.p.....	1000mL

.....

Resultados

.....

4. RESULTADOS

4.1. Ensaios *in vitro*

4.1.1. Avaliação da capacidade de ligação da galectina-1 com taquizoítas de *N. caninum*

O primeiro objetivo deste estudo foi investigar a capacidade de a galectina-1 se ligar aos taquizoítas de *N. caninum* (cepa Nc1-selvagem e cepa geneticamente modificada Nc1-LacZ). Para isso, foram conduzidos ensaios em que taquizoítas do parasita foram incubados com gal-1 conjugada com FITC (gal-1^{FITC}) e posteriormente analisados por diferentes metodologias: citometria de fluxo e microscopia confocal.

4.1.1.1. Análise por Citometria de Fluxo

Inicialmente, com o intuito de analisar se a gal-1 se liga ao taquizoíta de Nc e se essa possível ligação ocorre de modo carboidrato-dependente, realizamos o ensaio de *binding* utilizando dois açúcares como controle: a lactose, que se liga à gal-1 via sítio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e, assim, compete com outro ligante pelo sítio específico, e a sacarose, que não apresenta essa ligação CRD-específica

Através dos histogramas de fluorescência é possível observar uma diminuição da intensidade de fluorescência quando gal-1 é previamente incubada com lactose (Figura 6D), verificada pelo deslocamento do histograma (mediana de intensidade de fluorescência - MIF) para a esquerda, quando comparada com a incubação feita apenas com a gal-1 (Figura 6C). Tal fenômeno sugere uma limitação (por competição) na ligação da gal-1 à superfície do parasita. Quando incubada com sacarose, a intensidade de fluorescência, representada pelo histograma da figura 6E, se aproxima do valor obtido para a incubação apenas com galectina, mostrando que a incubação prévia com sacarose pouco interferiu na ligação ao parasita.

Figura 6. Citograma e histogramas de fluorescência da análise da capacidade de ligação de gal-1 com taquizoítas de Nc por citometria de fluxo. 1×10^6 taquizoítas de Nc foram incubados com de gal-1^{FITC} (5 μ M). Lactose ou sacarose (20mM) foram usado como controles positivo e negativo de ligação CRD (domínio de reconhecimento de carboidrato)-específica, respectivamente. **A:** Citograma bidirecional indicando a população de taquizoítas analisada contida na área P1; separação das células pela complexidade (eixo vertical) e tamanho (eixo horizontal). **B:** Histograma de fluorescência inespecífica (taquizoítas de Nc) utilizada para calibrar o aparelho. **C:** Histograma de fluorescência da ligação Nc + gal-1^{FITC}. **D:** Histograma de fluorescência Nc + gal-1^{FITC} previamente incubada com lactose. **E:** Histograma de fluorescência Nc + gal-1^{FITC} previamente incubada com sacarose.

No gráfico representativo do ensaio da capacidade de ligação da gal-1 com taquizoítas de Nc por citometria de fluxo, é possível observar uma alta mediana de intensidade de fluorescência (Figura 7A) e alta porcentagem de células marcadas (próximo de 98%) (Figura 7B) referentes às células incubadas com gal-1 (5 μ M). Tal resultado evidencia a capacidade de interação da galectina com glicanas da superfície do parasita. A incubação prévia de gal-1 com lactose reduziu sua capacidade de ligação a Nc, (Figura 7A, coluna intermediária) com diminuição da intensidade de fluorescência por célula ($p < 0,0001$) e também no número de células fluorescentes ($p = 0,0008$) (B). Quando incubado com sacarose, tanto os valores da mediana de intensidade de fluorescência quanto da porcentagem de células marcadas se aproximaram do valor obtido para a incubação apenas com galectina-1. Estes dados sugerem que a ligação da gal-1 ao parasita ocorre via CRD-carboidrato específico da

membrana do parasita, uma vez que a lactose previamente incubada com a gal-1 inibiu a ligação desta lectina com o parasita.

Figura 7. Avaliação da capacidade de ligação de gal-1 com taquizoítas de Nc via domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) por citometria de fluxo. 1×10^6 taquizoítas de Nc foram incubados com $5 \mu\text{M}$ de gal-1^{FITC}. Gal-1 previamente incubada com lactose ou sacarose (20mM) foi usada como controles positivo e negativo de ligação CRD-específica, respectivamente. A mediana de intensidade de fluorescência e a porcentagem de células positivas para a marcação foram analisadas por citometria de fluxo. **A:** mediana de intensidade de fluorescência (MIF); **B:** % de células fluorescentes. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (*one-way* ANOVA), seguida de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p=0,0008$; ** $p<0,0001$; NS: não significativo.

O próximo passo foi verificar se essa ligação ocorre de maneira dose-dependente. Foram realizados ensaios com diferentes concentrações de gal-1 (8 , 4 e $1 \mu\text{M}$), também utilizando lactose e sacarose como controles. Foi observado que a gal-1 se liga aos taquizoítas de Nc de maneira dose-dependente e que a incubação prévia da gal-1 ($4 \mu\text{M}$) com lactose inibiu a ligação ao parasita, apresentando valores de mediana de intensidade de fluorescência (MIF) (Figura 8A) e de células fluorescentes (Figura 8B) próximos aos obtidos para a concentração mais baixa ($1 \mu\text{M}$).

Figura 8. Avaliação da capacidade de ligação da gal-1 com taquizoítas de Nc de maneira dose-dependente por citometria de fluxo. 1×10^6 taquizoítas de Nc foram incubados com 8, 4 e $1 \mu\text{M}$ de gal-1^{FITC}. Além disso, gal-1 ($4 \mu\text{M}$) previamente incubada com lactose ou sacarose (20mM) foi usada como controles positivo e negativo de ligação CRD-específica, respectivamente. A mediana de intensidade de fluorescência e a porcentagem de células positivas para a marcação foram analisadas por citometria de fluxo. **A:** mediana de intensidade de fluorescência (MIF); **B:** % de células fluorescentes. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (*one-way ANOVA*), seguida de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. $p > 0,05$.

4.1.1.2. Análise por Microscopia Confocal

Concomitante ao ensaio de *binding* por citometria de fluxo, com o intuito de melhor observar o perfil de interação da galectina com o parasita e determinar a localização da galectina na superfície do taquizoíta, foram confeccionadas lâminas de imunofluorescência para visualização em microscópio confocal. Para este ensaio, foram utilizadas duas cepas, Nc1-selvagem e Nc1-LacZ, esta última foi utilizada nos estudos *in vivo* desenvolvidos nesse trabalho. Foi possível verificar que o padrão de ligação da gal-1 ao parasita foi o mesmo em ambas as cepas (Figura 10 - cepa Nc1-selvagem, Figura 11 - Nc1-LacZ e Figura 9 - controle). Este resultado validou a utilização da cepa Nc1-LacZ nos estudos *in vivo*, pois, não havendo divergência no padrão de ligação da gal-1 ao parasita, é possível que o padrão de resposta observado *in vivo* seja extrapolado para a infecção pelo Nc selvagem.

Figura 9. Análise do perfil de ligação de galectina-1 com *N. caninum* por microscopia confocal - controle negativo. Tachizoítas de *N. caninum* purificados marcados com iodeto de propídeo (PI - 1 µg/µL), sem incubação prévia com galectina-1 conjugada com FITC. A: visualização dos tachizoítas no campo claro, B: visualização do núcleo do parasita marcado com PI, campo claro, C: campo sem identificação de fluorescência inespecífica, campo escuro, D: visualização do núcleo do parasita marcado com PI, campo escuro.

Figura 10. Análise do perfil de ligação de galectina-1 com *N. caninum* por microscopia confocal – linhagem Nc1-selvagem. Tachizoítas de Nc1-selvagem purificados incubados com gal-1 (5 µM) conjugada com FITC (45 minutos, 4°C) e posterior marcação com iodeto de propídeo (PI - 1 µg/µL). A: visualização dos tachizoítas no campo claro, B: visualização do núcleo do parasita marcado com PI, campo escuro, C: visualização do tachizoíta marcado com FITC, evidenciando a ligação de gal-1 em toda a extensão do parasita, campo escuro, D: sobreposição das imagens C e D.

Figura 11. Microfotografias da análise do perfil de ligação de galectina-1 com *N. caninum* por microscopia confocal – Nc1-LacZ. Taquizoítas de Nc1-lacZ purificados incubados com gal-1 (5 µM) conjugada com FITC (45 minutos, 4°C) e posterior marcação com iodeto de propídeo (PI - 1 µg/µL). A: visualização dos taquizoítas no campo claro, B: visualização do núcleo do parasita marcado com PI, campo escuro, C: visualização do taquizoíta marcado com FITC, evidenciando a ligação de gal-1 em toda a extensão do parasita, campo escuro, D: sobreposição das imagens C e D.

O fato de a gal-1 se ligar ao taquizoíta de Nc abriu indagações, uma vez que a interação pode influenciar positiva ou negativamente o processo de invasão do parasita. Neste sentido, antes de iniciar o estudo do papel de gal-1 em um modelo de infecção *in vivo*, o próximo objetivo do trabalho foi avaliar a ação de galectina-1 sobre a invasão de *N. caninum* em diferentes modelos celulares *in vitro*.

4.1.2. Avaliação *in vitro* da ação da galectina-1 sobre a invasão de *N. caninum* em diferentes modelos celulares

A facilidade de obtenção de monocamadas de células VERO levou à verificação dos efeitos da galectina sobre a invasão de *N. caninum*-LacZ nessas células antes da aplicação em modelos mais elaborados. Tanto os taquizoítas de *N. caninum* quanto as monocamadas de células VERO foram incubados alternadamente com galectina-1, previamente ao ensaio de invasão. Foram utilizadas diferentes concentrações de galectina no ensaio (50; 5; 0,5 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$). Não foi observada a inibição da invasão pela presença de galectina nos ensaios com Nc previamente incubados com gal-1, nem quando as células VERO foram previamente incubadas com esta galectina (Figura 12).

Figura 12. Avaliação da ação da galectina-1 sobre a invasão de *N. caninum* em células VERO. Taquizoítas de Nc1-lacZ purificados (barras do lado esquerdo) ou monocamadas de células VERO (barras do lado direito) foram incubados alternadamente com diferentes concentrações de gal-1 (50 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,05 $\mu\text{g/mL}$) por 2 horas a 37°C e posteriormente incubados juntos para o processo de invasão. Valores dados em densidade óptica (D.O.) em 570nm, proporcional à atividade de β -galactosidase, determinada por reação enzimática com CPRG. Valores referentes a três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (*one-way* ANOVA), seguida de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. $p > 0,05$.

Os ensaios *in vitro* relacionados à investigação do papel da galectina no processo de invasão de Nc mostraram que embora a gal-1 seja capaz de se ligar aos taquizoítas de *N. caninum* via CRD (Figuras 10 e 11), esta ligação lectina-parasita não interfere na capacidade invasiva do parasita às células VERO. Foi dado prosseguimento à investigação da ação da galectina sobre a invasão por Nc em outros modelos celulares e o estudo foi direcionado para a utilização de macrófagos obtidos

comercialmente como célula hospedeira. Da mesma forma que observado com células VERO, foi possível verificar que a ligação gal-1-Nc não interfere na capacidade invasiva do parasita aos macrófagos (Figura 13).

Figura 13. Avaliação da ação da galectina-1 sobre a invasão de *N. caninum* em macrófagos. Taquizoítas de Nc1-lacZ purificados (barras do lado esquerdo) ou macrófagos (barras do lado direito) foram incubados alternadamente com diferentes concentrações de gal-1 (50µg/mL, 5µg/mL, 0,5µg/mL, 0,05µg/mL) por 2 horas a 37°C e posteriormente incubados juntos para o processo de invasão. Valores dados em densidade óptica (D.O.) em 570nm, proporcional à atividade de β-galactosidase, determinada por reação enzimática com CPRG. Valores referentes a três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (*one-way ANOVA*), seguida de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. $p > 0,05$.

4.1.3. Avaliação *in vitro* da capacidade de proliferação de *N. caninum* no interior de diferentes modelos celulares

Inicialmente houve a necessidade de padronização do melhor tempo de incubação para o ensaio de proliferação de Nc e as células esplênicas foram escolhidas para a condução deste ensaio, uma vez que nosso objetivo também era investigar a capacidade de Nc se proliferar no interior destas células. A expressão de Lac-Z possibilitou um meio mais rápido de quantificar a invasão de Nc através do ensaio enzimático de CPRG. O ensaio de proliferação em esplenócitos foi avaliado também por citometria de fluxo, através da marcação dos taquizoítas com anticorpos anti-βgal. Nc foi capaz de se proliferar no interior das células esplênicas e foi observado um aumento exponencial do número de taquizoítas às 72h de incubação, para as duas metodologias, CPRG (Figura 14A) e citometria de fluxo (Figura 14B).

Figura 14. Ensaio de proliferação de *N. caninum* em células esplênicas. Taquizoítas de Nc1-lacZ purificados (1×10^6) e incubados com células esplênicas em cultura por um período de 72h para proliferação no interior destas células. **A:** Ensaio enzimático de CPRG; valores dados em densidade óptica (D.O.) em 570nm, proporcional à atividade de β -galactosidase, determinada por reação enzimática com CPRG. **B:** Ensaio de citometria de fluxo; marcação dos taquizoítas com anticorpos anti- β gal. Leituras realizadas nos diferentes tempos de incubação (0, 1, 2, 4, 18, 24 e 72 horas). * $p < 0,0001$ (One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

Ainda utilizando macrófagos como modelo de célula hospedeira, foi realizado o ensaio de proliferação, cujo objetivo foi verificar a capacidade de Nc sobreviver aos mecanismos de *killing* dos macrófagos e se proliferar no interior destas células, superando a ação das enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Para isso, taquizoítas de Nc-lacZ (1×10^3 , 5×10^3 e 1×10^4) foram incubados com macrófagos por 72 horas. As leituras das absorbâncias são proporcionais à quantidade do parasita e mostram que houve proliferação do parasita também no interior dos macrófagos (Figura 15). Desta forma, os ensaios indicam que, assim como células VERO, células esplênicas e macrófagos são modelos eficazes para o estudo *in vitro* do processo de invasão por *N. caninum*.

Figura 15. Ensaio de proliferação de *N. caninum* em macrófagos. Taquizoítas de Nc1-lacZ purificados e incubados com macrófagos em cultura por um período de 72h para proliferação no interior destas células. Diferentes concentrações de taquizoítas (1×10^3 , 5×10^3 e 1×10^4) foram incubadas com macrófagos previamente aderidos à placa de cultivo celular.

Valores dados em densidade óptica (D.O.) em 570nm, proporcional à atividade de β -galactosidase, determinada por reação enzimática com CPRG. * $p < 0,0001$ (One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

4.2. Ensaios *in vivo*

4.2.1. Influência da ação da galectina-1 sobre a resposta imune contra *N. caninum*

Os resultados apresentados a partir desta seção são referentes aos ensaios *in vivo* envolvendo a infecção de camundongos C57BL/6 machos selvagens ($WT^{gal-1+/+}$) e/ou nocautes ($KO^{gal-1-/-}$) para o gene da galectina-1 com Nc1-LacZ e o tratamento com gal-1 recombinante humana exógena.

4.2.1.1. Análise do peso dos baços de camundongos infectados com Nc-lacZ

Como forma de avaliar a possível instalação de uma infecção nos camundongos desafiados com Nc, que tem como característica a ativação dos mecanismos efetores do sistema imunológico, bem como analisar o papel da galectina nesta infecção, dados dos pesos dos baços dos camundongos foram obtidos. Para os camundongos $WT^{gal-1+/+}$, nos três tempos de infecção (5, 8 e 15 dias) foi observado um aumento no peso do baço nos animais infectados (I e IT), sendo esta diferença mais proeminente no período de 5 dias de infecção (Figura 16), em que houve diferença significativa entre os grupos C e I e os grupos CT e IT ($p < 0,0001$). Foi observado também um aumento significativo no peso dos baços de camundongos $KO^{gal-1-/-}$ infectados aos 8 dias de infecção (Figura 17). Não foi evidenciado nenhum efeito de gal-1 endógena ou exógena sobre o peso dos baços.

Figura 16. Peso dos baços dos camundongos $WT^{gal-1/+}$ infectados com $Nc-lacZ$ e tratados com gal-1 exógena. Ensaios realizados aos 5, 8 e 15 dias de infecção. C: controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas. *** $p < 0,0001$; * $p = 0,0042$ (One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

Figura 17. Peso dos baços dos camundongos $KO^{gal-1/-}$ infectados com $Nc-lacZ$ e tratados com gal-1 exógena. Ensaios realizados aos 8 e 15 dias de infecção. C: controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas. * $p = 0,0159$ (One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

Corroborando com a diferença no peso observada para os camundongos infectados, a imagem de amostras de baços extraídos de animais dos grupos C, CT, I e IT (Figura 18) visivelmente evidencia a diferença de tamanho dos baços entre os grupos controles e infectados, indicando a alta atividade desse órgão linfóide em resposta à infecção.

Figura 18. Análise comparativa do tamanho dos baços de camundongos $WT^{gal-1+/+}$ infectados com *Nc-lacZ* e tratados com gal-1 exógena. Fotografia de amostras de baços extraídos de camundongos machos C57BL/6 aos 8 dias de infecção. C: controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Evidência da diferença no tamanho dos baços entre os grupos controles e infectados.

4.2.1.2. Quantificação do parasita *N. caninum* na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *Nc-lacZ*

Com o intuito de investigar a capacidade da gal-1 (endógena ou exógena) interferir no processo invasivo/proliferativo de *Nc* e/ou na possível modulação da resposta do hospedeiro contra a infecção *in vivo*, foi feita a quantificação do parasita no interior de células da cavidade peritoneal por clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) nos 5º, 8º e 15º dias após a infecção. Pela primeira vez, taquizoítas *Nc-lacZ* puderam ser quantificados por esta metodologia *in vivo*.

Em camundongos selvagens ($WT^{gal-1+/+}$), com 5 dias de infecção e tratamento com gal-1, foi observada uma alta carga parasitária na cavidade peritoneal, a qual diminuiu drasticamente com 8 dias de infecção, aproximando-se de zero 15 dias após a inoculação *in vivo* do parasita ($p < 0,0001$) (Figura 19A). Foi possível observar que o grupo infectado com *Nc1-lacZ* e tratado com gal-1 (IT) apresentou uma diminuição significativa da carga parasitária na cavidade peritoneal, ou uma maior resistência à infecção, quando comparado ao grupo sem tratamento (I). Em contrapartida, no

período de 8 dias, o tratamento dos animais infectados com gal-1 levou a um aumento da carga parasitária na cavidade peritoneal, tanto para camundongos $WT^{gal-1+/+}$ quanto $KO^{gal-1-/-}$ (Figura 19B).

Figura 19. Quantificação de *N. caninum* por CPRG em células da cavidade peritoneal de camundongos $WT^{gal-1+/+}$ e $KO^{gal-1-/-}$ infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. **A:** Ensaios realizados nos 5º, 8º e 15º dias de infecção em animais $WT^{gal-1+/+}$. **B:** Ensaio realizado no 8º dia de infecção em animais $KO^{gal-1-/-}$. Valores dados em absorbância em 570nm, proporcional à expressão de lacZ. Grupos C: controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Os resultados estão apresentados em densidade óptica (D.O.) em 570nm, proporcional à expressão de lacZ. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) (One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

4.2.1.3. Avaliação da produção de óxido nítrico pelas células da cavidade peritoneal de camundongos infectados com Nc-lacZ

Ainda buscando avaliar o impacto da ausência da gal-1 endógena e papel da gal-1 exógena na infecção aguda por Nc, foi realizado o ensaio de quantificação da produção de óxido nítrico (NO) por células provenientes da cavidade peritoneal. A infecção com Nc estimulou a produção de NO e esta produção foi mais pronunciada nos primeiros dias de infecção (5 dias) (Figura 20A). É interessante destacar que mesmo sem um segundo estímulo *in vitro* houve a produção aumentada de NO por células provenientes de camundongos infectados com Nc. Além disso, foi visto que o extrato de Nc foi capaz de induzir maior produção de NO *in vitro* que o estímulo com LPS. A suplementação com gal-1 exógena estimulou a produção de NO em camundongos WT^{gal-1+/+} infectados.

Com relação aos animais KO^{gal-1-/-}, no geral foi visto um acúmulo bem maior de nitrito no sobrenadante da cultura de células desses animais se comparado com células provenientes dos animais WT^{gal-1+/+} (chegando a cerca de 100 vezes maior quando estimuladas com extrato total de Nc aos 8 dias de infecção) (Figuras 20B e 20C). Essa diferença não foi observada apenas entre os grupos infectados ($p < 0,0001$), mas também entre a produção de nitrito por células provenientes de camundongos KO^{gal-1-/-} não infectados ($p < 0,001$), o que indica que a gal-1 endógena tem um potente efeito na inibição da geração de NO, no grupo infectado. Um dado bastante interessante é que, aos 8 dias de infecção, a suplementação com gal-1 exógena inibiu a produção de NO em camundongos infectados, reafirmando o potencial de modulação negativa na produção de NO pela gal-1. Para os animais KO^{gal-1-/-} não infectados, porém, nesse mesmo período, foi observada uma modulação positiva na produção de NO pela gal-1 exógena (Figura 12B, barras em verde).

Figura 20. Produção de óxido nítrico pelas células da cavidade peritoneal de animais $WT^{gal-1+/+}$ e $KO^{gal-1-/-}$ infectados com $Nc-lacZ$ e tratados com $gal-1$ exógena. Representação gráfica da produção de óxido nítrico pelas células obtidas da cavidade peritoneal em 5 (A), 8 (B) e 15 dias de infecção (C). Os gráficos em azul correspondem aos resultados de animais $WT^{gal-1+/+}$ e os gráficos em verde aos animais $KO^{gal-1-/-}$. Quantificação indireta de óxido nítrico, através do nitrito (μM) produzido por macrófagos provenientes da cavidade peritoneal de

camundongos C57BL/6 em resposta a dois tipos de estímulos: LPS e extrato de Nc. C: controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra, em cada gráfico, são diferentes estatisticamente (letras: $p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

4.2.1.4. Caracterização fenotípica e funcional das populações celulares peritoneais de camundongos infectados com Nc1-lacZ

Em um próximo passo do estudo, foi realizada a caracterização fenotípica e funcional das células infiltradas na cavidade peritoneal por citometria de fluxo, com o objetivo de avaliar se a ausência de gal-1 endógena e a suplementação com gal-1 exógena influenciam no recrutamento de células para o peritônio durante a infecção com Nc. Fazendo uso de anticorpos monoclonais específicos para a identificação de populações de granulócitos (Gr1-Ly6G⁺ F4/80⁻), macrófagos (F4/80⁺ MHCII⁺) e células dendríticas (CD11c⁺ MHCII⁺), foi possível evidenciar o perfil celular envolvido na infecção por *N. caninum*.

Tanto em camundongos WT^{gal-1+/+} quanto KO^{gal-1-/-}, foi observado um predomínio de células granulocíticas na cavidade peritoneal dos camundongos infectados com Nc aos 5 (WT^{gal-1+/+}) e 8 (WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1-/-}) dias de infecção, indicando o recrutamento de tais células inflamatórias para o sítio infeccioso no início da infecção (Figura 21A). Aos 8 dias de infecção, as porcentagens de granulócitos na cavidade peritoneal diminuíram significativamente nos animais infectados WT^{gal-1+/+} (65,1% para 23,8% no grupo I e 62,8% para 24,4 % no grupo IT) e esse decréscimo foi gradativo até os 15 dias. Em camundongos KO^{gal-1-/-}, a porcentagem de granulócitos foi similar à observada para os camundongos WT^{gal-1+/+} no 8º dia de infecção. Porém, no período de 15 dias, as porcentagens de granulócitos na cavidade peritoneal dos animais KO^{gal-1-/-} infectados diminuíram bem mais que nos animais WT^{gal-1+/+}.

A porcentagem total de macrófagos F4/80⁺ MHCII⁺ no conteúdo do lavado peritoneal de camundongos infectados (tanto WT^{gal-1+/+} quanto KO^{gal-1-/-}) diminuiu nos primeiros dias de infecção. Aos 8 dias de infecção, o mesmo padrão de diminuição ocorreu em animais WT^{gal-1+/+} e não foi observada nenhuma influência da suplementação com gal-1 exógena na resposta (Figura 21B). Porém, para os animais KO^{gal-1-/-}, o perfil de resposta foi diferente dos WT^{gal-1+/+}, evidenciando que a gal-1 endógena proporciona uma diminuição significativa do número de células monocíticas na cavidade peritoneal ($p=0,0186$), se comparado com o grupo WT^{gal-1+/+}, e a

suplementação com gal-1 exógena levou à diminuição da porcentagem de macrófagos peritoneais, tanto em animais saudáveis (8 e 15 dias) quanto em animais infectados (8 dias). Então, pôde-se inferir que a galectina-1 exerceu uma ação moduladora, levando à uma regulação negativa no recrutamento dessas células. Ainda com relação à população monocítica (F4/80⁺ MHCII⁺), é importante notar que, aos 15 dias de infecção, a carência de gal-1 endógena levou à diminuição de macrófagos no peritônio de animais infectados (passando de 70,7% para 32,6%), o que não foi observado para os animais WT^{gal-1+/+}.

Com relação às células dendríticas CD11c⁺ MHCII⁺, não houve alteração significativa do padrão de resposta frente à infecção com Nc (Figura 21C) nestes animais, embora possa ser observada uma tendência à diminuição da porcentagem celular aos 8 dias de infecção em animais WT^{gal-1+/+}, mesmo perfil observado para os macrófagos neste tempo. Para os animais nocautes não foi observada nenhuma diferença.

Em suma, na caracterização fenotípica do infiltrado celular na cavidade peritoneal foi demonstrado que a infecção com Nc-lacZ foi capaz de induzir um acúmulo peritoneal de células granulocíticas (Ly6G/Gr-1⁺), esse evento, porém, não foi modificado pela presença de gal-1. Foi notado também que a infecção levou à diminuição dos macrófagos peritoneais (F4/80⁺ MHCII⁺) nos primeiros dias de infecção, e que a gal-1 endógena influencia no recrutamento dessas células, agindo de maneira diferente, de acordo com o tempo de infecção. Além disso, foi observado que a suplementação contribui para a diminuição do número dessas células (aos 8 dias de infecção) no peritônio, mas essa diferença só é percebida se o animal não expressar gal-1 endógena.

Figura 21. Caracterização fenotípica de células provenientes da cavidade peritoneal de camundongos WT^{gal-1/+} e KO^{gal-1/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica do padrão celular encontrado na cavidade peritoneal dos camundongos durante os 5º, 8º e 15º dias de infecção. A porcentagem de células positivas foi analisada por citometria de fluxo. **A:** % de granulócitos (células GR-1/Ly6G⁺ F4/80⁻); **B:** % de macrófagos (células F4/80⁺ MHCII⁺); **C:** % de células dendríticas (células CD11c⁺ MHCII⁺). Barras em azul são representativas de animais WT^{gal-1/+} e verdes de animais KO^{gal-1/-}. Grupos: C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra ou símbolo são diferentes estatisticamente (letras:

$p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: * $p = 0,0186$, *** $p = 0,0007$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

Adicionalmente, a população de macrófagos e células dendríticas foram avaliadas quanto à sua atividade, através da análise do perfil de expressão de alguns receptores de superfície, a saber, moléculas do complexo de histocompatibilidade principal II (MHCII) e receptores tipo Toll 2 (TLR2). Os ensaios foram realizados em animais selvagens e foi possível observar uma indução da ativação celular quando os camundongos foram infectados por Nc-lacZ.

Embora sem significado estatístico, a expressão de MHCII, dado por mediana de intensidade de fluorescência (MIF) por célula, mostrou-se maior em macrófagos infectados nos 5 dias de infecção quando comparado com grupo controle (Figura 22B), o que também foi observado em células dendríticas (Figura 22A). Aos 15 dias de infecção, foi possível observar uma diferença significativa do padrão de expressão de MHC em macrófagos, em que os grupos infectados apresentaram maior mediana de intensidade de fluorescência para essa molécula que o grupo controle (C). O tratamento com gal-1, porém, não levou a nenhuma diferença estatística no padrão de expressão das moléculas de MHCII.

Com relação à expressão de TLR2, tanto aos 5 quanto aos 8 dias de infecção, foi possível observar uma tendência à diminuição da intensidade de fluorescência por célula para os dois tipos celulares ($F4/80^+ MHCII^+$ e $CD11c^+ MHCII^+$) quando comparado com os animais saudáveis (Figura 23). Porém, só foi observada diferença significativa no padrão de expressão de TLR2 em macrófagos aos 8 dias de infecção. O tratamento com gal-1 não levou a nenhuma diferença no padrão de expressão de TLR2.

Assim, podemos inferir que Nc-lacZ foi capaz de induzir a ativação de células apresentadoras de antígenos nos primeiros de infecção avaliados, mas este evento não foi influenciado pelo tratamento com gal-1 exógena.

Figura 22. Expressão de MHC em células provenientes do lavado peritoneal de camundongos $WT^{gal-1/+}$ infectados com *Nc-lacZ* e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica da mediana de intensidade de fluorescência referente à expressão do antígeno I-A/I-E (molécula do MHC de classe II) em células oriundas da cavidade peritoneal. Resultados referentes aos 5º, 8º e 15º dias de infecção. **A:** mediana de intensidade de fluorescência de MHCII em células dendríticas (CD11c⁺); **B:** mediana de intensidade de fluorescência de MHC em macrófagos (F4/80⁺). A mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foi analisada por citometria de fluxo. Grupos: C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

Figura 23. Expressão de TLR2 em células provenientes do lavado peritoneal de camundongos $WT^{gal-1/+}$ infectados com *Nc-lacZ* e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica da mediana de intensidade de fluorescência referente à expressão de TLR2 (receptor tipo Toll 2) em células oriundas da cavidade peritoneal. Resultados referentes aos 5º, 8º e 15º dias de infecção. **A:** mediana de intensidade de fluorescência de TLR2 em células dendríticas (CD11c⁺); **B:** mediana de intensidade de fluorescência de TLR em macrófagos (F4/80⁺). A mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foi analisada por citometria de fluxo. Grupos: C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

4.2.1.5. Caracterização fenotípica e funcional das populações celulares provenientes dos baços de camundongos infectados com Nc1-lacZ

Ainda buscando entender os mecanismos envolvidos na infecção experimental por *N. caninum*, bem como o papel da gal-1 na modulação da resposta imunológica contra a infecção por esse parasita, o próximo passo do trabalho foi analisar o perfil das populações celulares presentes no baço dos animais selvagens ($WT^{gal-1+/+}$) e nocautes ($KO^{gal-1-/-}$) para a gal-1 endógena.

Primeiramente, pela marcação de células T $CD4^+$ nos animais $WT^{gal-1+/+}$, notou-se que nos três períodos estudados (5, 8 e 15 dias) houve uma diminuição destas células nos grupos infectados (I e IT), se comparados aos grupos controles (C e CT), quando analisada a população de leucócitos (Figura 24A). Tal diminuição foi significativa aos 5 e 15 dias de infecção para os camundongos $WT^{gal-1+/+}$. Para as células T $CD8^+$ nos animais $WT^{gal-1+/+}$, aos 15 dias pós-infecção (Figura 24B) foi observado um aumento significativo na porcentagem destas células no baço. Com relação ao papel da gal-1 exógena, não se pôde inferir nenhum efeito sobre ambos os tipos celulares ($CD4^+$ e $CD8^+$).

Ao analisar a caracterização fenotípica das células do baço de camundongos nocautes para o gene da gal-1 ($KO^{gal-1-/-}$) frente à infecção com Nc-LacZ, foi evidenciado que a infecção não levou à uma alteração significativa de nenhuma das populações celulares ($CD4^+$ e $CD8^+$). Com relação ao papel da galectina, porém, pôde-se inferir que esta exerceu uma ação moduladora, levando à uma imunossupressão celular no baço, para ambos os tipos celulares ($CD4^+$ e $CD8^+$) nos dois períodos estudados, sendo significativo para a população T $CD4^+$ nos 8 dias de infecção (Figura 24A).

É interessante notar que, embora não significativo, podemos sugerir que a gal-1 endógena seja responsável por uma redução do número de linfócitos T $CD4^+$, o que prejudica observar diferença com a suplementação exógena em animais $WT^{gal-1+/+}$. Em contrapartida, sugere-se que essa galectina endógena desempenhe uma regulação positiva nas células T $CD8^+$, evidenciado pela análise estatística aos 15 dias de infecção (Figura 24B).

Figura 24. Caracterização fenotípica das populações celulares provenientes do baço de camundongos WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica das porcentagens das populações celulares encontradas no baço nos períodos de 5, 8 e 15 dias de infecção. Barras em azul são representativas de animais WT^{gal-1+/+} e verdes de animais KO^{gal-1-/-}. A porcentagem de células positivas foi analisada por citometria de fluxo. **A:** porcentagem de células T CD4⁺; **B:** porcentagem de células T CD8⁺. Grupos: C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra ou símbolo são diferentes estatisticamente (letras: $p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: $*p < 0,0103$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

Além das alterações que a infecção por *N. caninum* e a gal-1 poderiam estar causando nas respostas desempenhadas pelas populações de linfócitos T, foram também analisados os perfis de resposta da população de linfócitos B (CD19⁺ MHCII⁺) em camundongos WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1-/-} suplementados com gal-1 exógena.

Para a investigação do padrão de ativação destas células, frente ao desafio por Nc, foi analisada a expressão de moléculas de MHC de classe II (MHCII) em tais células, através da mediana de intensidade de fluorescência por célula e a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86), através da porcentagem de células positivas para tais moléculas (CD19⁺ CD80⁺/CD86⁺) (Figura 25).

Com relação às moléculas CD80 e CD86, a infecção com Nc foi capaz de aumentar o número de células B expressando tais moléculas co-estimulatórias e a administração de galectina-1 não teve nenhum impacto sobre a expressão de moléculas de CD80 e CD86, como pode ser visto nos gráficos das figuras 25A e 25B, dados obtidos apenas em animais WT^{gal-1+/+}.

Figura 25. Expressão de CD80 e CD86 em células B (CD19⁺) do baço de camundongos WT^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. A: Representação gráfica das porcentagens da população de células CD19⁺ expressando CD80; **B:** Representação gráfica da porcentagem da população de células CD19⁺ expressando CD86. C, controle; CT:

controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

A expressão de MHCII exibiu perfil ativado em animais infectados com Nc-lacZ tanto para o grupo $WT^{gal-1/+}$ quanto $KO^{gal-1/-}$, em que foi observada diferença estatística entre as medianas de intensidade de fluorescência dos grupos controle (C) e infectado (I) até o oitavo dia de infecção (Figura 26). No 15º dia de infecção ainda foi possível observar uma sutil ativação das células B para as duas linhagens de camundongos.

É importante destacar que a gal-1 endógena atuou modulando positivamente a expressão de MHC em linfócitos B de animais infectados ($p = 0,0442$). Porém, a suplementação com gal-1 não gerou nenhuma diferença na resposta.

Figura 26. Expressão de MHCII em células B (CD19⁺) do baço de camundongos $WT^{gal-1/+}$ e $KO^{gal-1/-}$ infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) referente à expressão de MHCII em linfócitos B (CD19⁺). Barras em azul são representativas de animais $WT^{gal-1/+}$ e verdes de animais $KO^{gal-1/-}$. A MIF foi analisada por citometria de fluxo. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra ou símbolo são diferentes estatisticamente (letras: $p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: $*p = 0,0442$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

4.2.1.6. Detecção/Quantificação dos anticorpos específicos para *N. caninum* em soro de camundongos infectados com Nc-lacZ

Amostras de soros dos camundongos (apenas WT^{gal-1+/+}) foram analisados por ELISA para detecção de anticorpos específicos (IgM e IgG) contra Nc. Foi possível observar a presença de IgG aos 8 dias de infecção (Figura 27A), evidenciada pela diferença entre a produção de IgG pelo grupo controle (C) e o grupo infectado (I) ($p < 0,0001$), o que foi exacerbado aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$). Além disso, foi possível observar um aumento da produção de anticorpos IgG no grupo infectados e tratados com gal-1 (IT), quando comparados com infectados (I), em 15 dias de infecção ($p < 0,0001$). Este aumento da produção de IgG no grupo IT também foi evidenciado aos 8 dias de infecção, porém, não houve diferença estatística.

Com relação à produção de IgM, como pode ser observado no gráfico da figura 27B, houve a produção desta imunoglobulina em animais infectados aos 8 e 15 dias de infecção (diferença estatística entre os grupos C e I, $p < 0,0001$). Além disso, foi possível constatar um aumento na produção de IgM por camundongos infectados tratados com gal-1, aos 15 dias de infecção ($p < 0,0001$). Assim, sugere-se a gal-1 tenha um papel importante contra a infecção por Nc, estimulando a produção de anticorpos específicos contra o parasita, tanto IgG total quanto IgM.

Figura 27. ELISA para a detecção de anticorpos específicos (IgG e IgM) anti-*N.caninum* em amostras de soro de camundongos WT^{gal-1+/+} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Ensaio realizado em 8 e 15 dias após infecção. Diluição do soro 1:500. **A:** Produção de IgG; **B:** Produção de IgM. Grupos C: controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) (One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

4.2.1.7. Quantificação de citocinas intracelulares e secretadas por células T esplênicas de camundongos infectados com Nc-lacZ

Sabe-se que a produção de citocinas específicas em resposta a um desafio com Nc é essencial para o controle da infecção. Assim, dando continuidade ao estudo dos mecanismos envolvidos na infecção experimental por *N. caninum*, bem como o papel da gal-1 na modulação da resposta imunológica contra a infecção por esse parasita, partimos para a análise funcional das células esplênicas, almejando a

identificação do padrão de citocinas produzidas por estas células. Para isso, os resultados aqui apresentados são referentes aos ensaios de citometria de fluxo para detecção de citocinas intracelulares (IFN- γ e IL-10) produzidas por células T esplênicas (CD4⁺ e CD8⁺) e aos ensaios de ELISA, para quantificar as citocinas secretadas pelas células esplênicas no meio extracelular (IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-6).

A infecção por Nc estimulou a produção de citocinas IFN- γ por células T CD4⁺ em 8 dias de infecção tanto em camundongos selvagens (WT^{gal-1+/+}) quanto em nocautes (KO^{gal-1-/-}), porém há significância estatística apenas nos grupos WT^{gal-1+/+} infectados (Figura 28A), porém não foi observado uma regulação positiva da expressão por célula (Figura 28B).

Figura 28. Detecção intracelular de IFN- γ em células T CD4⁺ esplênicas de camundongos WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica da porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ ⁺ (A) e da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de IFN- γ nestas células (B). Barras em azul são representativas de animais WT^{gal-1+/+} e verdes de animais KO^{gal-1-/-}. A % de células marcadas

e a MIF foram analisadas por citometria de fluxo. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente (letras: $p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: $*p = 0,0172$ – teste t de Student para amostras não pareadas).

A produção de IFN- γ por células T CD8⁺, por outro lado, foi mais intensa e se estendeu por um período maior de tempo que a produção por células T CD4⁺ frente à infecção em animais WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1-/-}. Foi observado um aumento significativo também aos 15 dias de infecção nos grupos infectados em relação aos controles, não apenas com relação ao número de células IFN- γ ⁺, mas também na mediana de intensidade de fluorescência (Figuras 29A e 29B).

Há de se destacar que a presença da gal-1 endógena exerce um papel na regulação negativa da produção de IFN- γ tanto por células T CD4⁺ quanto T CD8⁺ no início da infecção (8 dias) e depois esse papel se inverte, demonstrado pelo número aumentado de células produtoras dessa citocina aos 15 dias de infecção em animais WT^{gal-1+/+} ($p < 0,05$), sugerindo um balanço homeostático da resposta imunológica no decorrer de um quadro de infecção. Já na ausência de gal-1 endógena (KO^{gal-1-/-}), ou seja, quando não há essa regulação negativa da produção de IFN- γ inicial (8 dias), é possível observar o papel imunomodulador da gal-1 exógena em animais tratados (I $\neq$ IT, $p < 0,05$) (Figura 29A, barras em verde). Tal fato reafirma o papel da gal-1 na inibição da produção de IFN- γ nos primeiros dias de infecção.

Figura 29. Detecção intracelular de IFN-γ em células TCD8⁺ esplênicas de camundongos WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica da porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ⁺ (A) e da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de IFN-γ nestas células (B). Barras em azul são representativas de animais WT^{gal-1+/+} e verdes de animais KO^{gal-1-/-}. A % de células marcadas e a MIF foram analisadas por citometria de fluxo. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente (letras: $p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: $*p = 0,0223$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

Corroborando com os resultados apresentados na análise da detecção intracelular de IFN-γ, foi demonstrada uma alta secreção desta citocina aos 8 dias de infecção (grupo C ≠ I), tanto para camundongos WT^{gal-1+/+} quanto KO^{gal-1-/-} (Figura 30), evidenciando diferença significativa quando células de animais KO^{gal-1-/-} foram estimuladas com extrato de Nc.

Além disso, confirmando o que foi visto para os animais KO^{gal-1-/-} na análise intracelular, a suplementação com gal-1 apresentou um papel na diminuição da

secreção de IFN- γ por células esplênicas (I: 5.160pg/mL; IT: 2.020pg/mL) quando estas foram estimuladas com extrato de Nc (este estímulo foi feito apenas no KO^{gal-1-/-}). Ou seja, é possível afirmar que a gal-1 exógena exerceu uma ação moduladora, levando à inibição da produção e secreção de IFN- γ em camundongos KO^{gal-1-/-} (Figura 30).

Um outro dado interessante é que a concanavalina-A (uma outra lectina) parece não estimular a secreção de IFN- γ por células esplênicas destituídas de gal-1 endógena, sugerindo que a expressão de gal-1 nessas células tenha um papel na ativação da secreção de IFN- γ mediada pela con-A.

Figura 30. Quantificação de IFN- γ secretado por células esplênicas de camundongos WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1-/-} infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica dos ensaios de ELISA realizados em 5 e 8 dias de infecção para camundongos WT^{gal-1+/+} e 8 dias para KO^{gal-1-/-}. Gráfico em azul refere-se aos resultados para camundongos WT^{gal-1+/+} e em verde aos animais KO^{gal-1-/-}. Esplenócitos estimulados com Concanavalina-A (Con-A) e/ou extrato de Nc para a secreção de citocinas por um período de 72h. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: *** $p < 0,0001$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

Seguindo a investigação do impacto da gal-1 na produção de citocinas, o próximo passo foi quantificar as células T produtoras de IL-10. Os resultados apresentados para essa citocina intracelular foram referentes ao estudo em camundongos nocautes apenas. Um dado bastante expressivo foi a indução da produção de IL-10 em animais KO^{gal-1-/-} infectados e tratados com gal-1 exógena, tanto por células T CD4⁺ (Figura 31A) quanto CD8⁺ (Figura 31B) no grupo IT aos 8 dias,

evidenciado novamente o papel imunomodulador da gal-1. Estes resultados estão em consonância com o observado para a produção de IFN- γ por camundongos $KO^{gal-1/-}$ neste mesmo período de tempo, uma vez que são citocinas de padrões antagônicos de resposta.

Figura 31. Detecção intracelular de IL-10 em células TCD4⁺ e TCD8⁺ esplênicas de camundongos $KO^{gal-1/-}$ infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica da porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IL-10⁺ (A) e de células T CD8⁺ IL-10⁺ (B). A % de células marcadas foi analisada por citometria de fluxo. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

A quantificação de IL-10 secretada no sobrenadante da cultura de células esplênicas confirma a ação moduladora da gal-1 exógena, estimulando a secreção desta citocina. Esse evento pôde ser observado não apenas em animais deficientes da gal-1 endógena ($KO^{gal-1/-}$) ao 8º dia de infecção, mas também em camundongos

selvagens, com um aumento significativo aos 5 dias de infecção (I: 710pg/mL; IT: 1060pg/mL) (Figura 32).

É interessante ressaltar também que células esplênicas de camundongos $KO^{gal-1/-}$ secretaram menos IL-10 para o meio extracelular que células selvagens, quando estimuladas *in vitro* com con-A ($p<0,05$), sugerindo que a gal-1 endógena atue no aumento da secreção dessa citocina. Assim, pode-se notar que o efeito modulador da gal-1 exógena foi muito mais eficiente em camundongos $KO^{gal-1/-}$.

Figura 32. Quantificação de IL-10 secretada por células esplênicas de camundongos $WT^{gal-1+/+}$ e $KO^{gal-1/-}$ infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica dos ensaios de ELISA realizados em 5 e 8 dias de infecção para camundongos $WT^{gal-1+/+}$ e 8 dias para $KO^{gal-1/-}$. Gráfico em azul refere-se aos resultados para camundongos $WT^{gal-1+/+}$ e em verde aos animais $KO^{gal-1/-}$. Esplenócitos estimulados com Concanavalina-A (Con-A) e/ou extrato de Nc para a secreção de citocinas por um período de 72h. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente (letras: $p<0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: * $p<0,0498$, ** $p<0,0021$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

Na quantificação de IL-4 secretada por células esplênicas de camundongos selvagens nos diferentes grupos experimentais, observou-se novamente uma ação imunomoduladora da gal-1, atuando na estimulação da produção desta citocina no 5º e 8º dias pós-infecção nos animais infectados tratados (Figura 33).

Figura 33. Quantificação de IL-4 secretada por células esplênicas de camundongos $WT^{gal-1+/+}$ infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica dos ensaios de ELISA realizados em 5 e 8 dias de infecção. Esplenócitos estimulados com Concanavalina-A (Con-A) e para a secreção de citocinas por um período de 72h. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

O mesmo padrão de estímulo foi constatado para IL-6 secretada por células esplênicas. Foi observado que a infecção com Nc levou a uma produção expressiva desta citocina, tanto em camundongos $WT^{gal-1+/+}$ quanto $KO^{gal-1-/-}$, ao 8º dia de infecção (Figura 34). Além disso, foi possível constatar que a deficiência de gal-1 endógena estimulou a secreção de IL-6 pelas células esplênicas (tanto em grupo controle quanto infectado com Nc, $p=0,0083$ e $p=0,0008$, respectivamente), sendo possível inferir que a gal-1 endógena regula negativamente a secreção desta citocina. Porém, com relação à gal-1 exógena, foi observado que suplementação levou ao aumento significativo da produção de IL-6 em camundongos selvagens.

A tabela 3 sumariza nossos resultados, trazendo uma apresentação qualitativa da influência da gal-1 (endógena e exógena) sobre vários parâmetros imunológicos observada na infecção experimental por *N. caninum*.

Figura 34. Quantificação de IL-6 secretada por células esplênicas de camundongos $WT^{gal-1+/+}$ e $KO^{gal-1-/-}$ infectados com Nc-lacZ e tratados com gal-1 exógena. Representação gráfica dos ensaios de ELISA realizados em 8 dias de infecção para camundongos $WT^{gal-1+/+}$ (gráfico azul) e $KO^{gal-1-/-}$ (gráfico verde). Esplenócitos estimulados com Concanavalina-A (Con-A) e/ou extrato de Nc para a secreção de citocinas por um período de 72h. C, controle; CT: controle tratado com gal-1; I: infectado; IT: infectado tratado com gal-1. Colunas que compartilham a mesma letra são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ - One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Tukey; símbolos: $**p=0,0083$, $***p=0,0008$ - teste t de Student para amostras não pareadas).

Tabela 3: Sumários dos resultados apresentados de forma qualitativa.

Parâmetros imunológicos	Infecção com Nc1-lacZ (C x I)	Gal-1 Endógena (WT ^{gal-1+/+} x KO ^{gal-1/-})	Infecção com Nc1-lacZ e suplementação com gal-1 exógena	
			WT ^{gal-1+/+}	KO ^{gal-1/-}
Carga parasitária	+	SM	- ⁵ + ⁸	+ ⁸
ON	+	-	+	- ⁸ + ¹⁵
Granulócitos (Ly6G-Gr-1 ⁺)	+	SM	SM	SM
Macrófagos (F4/80 ⁺)	-	- ⁸ + ¹⁵	+ ⁸	- ⁸
MIF MHCII (F4/80 ⁺)	+	ND	SM	ND
MIF TLR2 (F4/80 ⁺)	-	ND	SM	ND
% células T CD4 ⁺	-	SM	SM	- ⁸
% células T CD8 ⁺	SM	+ ¹⁵	SM	SM
% células B (CD19 ⁺)	+	ND	SM	ND
MIF MHCII (CD19 ⁺)	+	+ ⁸	SM	SM
IgG e IgM	+	ND	+ ¹⁵	ND
% TCD4 ⁺ IFN- γ ⁺	+	+ ¹⁵	SM	SM
% TCD8 ⁺ IFN- γ ⁺	+	+ ¹⁵	SM	- ⁸
Secreção IFN- γ	+	+ ⁸	+ ⁵	- ⁸
% CD8 ⁺ IL-10 ⁺	SM	ND	ND	+ ⁸
Secreção IL-10	+	+ ⁸	+ ⁵	+ ⁸
Secreção IL-4	SM	ND	+ ⁸	ND
Secreção IL-6	+	- ⁸	+ ⁸	SM

Nc: *N. caninum*, gal-1: galectina-1, WT^{gal-1+/+}: selvagem, KO^{gal-1/-}: nocaute, (+): modulação positiva, (-): modulação negativa, SM: sem modulação, ND: não determinado, ⁵: 5 dias de infecção, ⁸: 8 dias de infecção, ¹⁵: 15 dias de infecção, ON: óxido nítrico, MIF: mediana de intensidade de fluorescência, MHCII: molécula do complexo de histocompatibilidade principal II, TLR2: *Toll-Like 2* receptor, Ig: imunoglobulina, IL-interleucina, IFN: interferon.

.....

Discussão

.....

5. DISCUSSÃO

No desenvolvimento deste estudo, exploramos diversos aspectos da resposta imunológica envolvida na infecção experimental aguda por *Nespora caninum* (Nc). Entender a participação da galectina-1 (gal-1) endógena e da gal-1 recombinante humana exógena nesse modelo de infecção por Nc foi nosso principal objetivo ao longo deste trabalho. Além disso, a interação da gal-1 exógena com o parasita e seu papel no processo invasivo *in vitro* pôde ser avaliada em alguns modelos celulares. Estudos como este, direcionados para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica frente a uma infecção por Nc, tem importância não apenas para auxiliar no desenvolvimento de métodos para o controle da neosporose, como também contribui com a literatura a respeito da relação entre mamíferos e protozoários.

5.1. Papel da gal-1 no processo de invasão por *N. caninum in vitro*

Parasitas do filo Apicomplexa variam em sua capacidade de invadir diferentes tipo celulares. A forma taquizoíta, que é a forma de replicação rápida associada à infecção aguda em animais de sangue quente, pode invadir a grande maioria das células nucleadas, e esta capacidade é compartilhada pelos coccídeos, enteroparasitas formadores de cistos nos tecidos, incluindo *N. caninum* (FRENKEL; SMITH, 2003). Considerando que a especificidade para um determinado hospedeiro definitivo é bastante alta entre os apicomplexa, eles compartilham a habilidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros intermediários (FRIEDRICH; MATTHEWS; SOLDATI-FAVRE, 2010). Para investigar a capacidade de Nc invadir e se proliferar no interior de diferentes tipos celulares, foram realizados ensaios de invasão em células VERO, linhagem celular mais utilizada para cultivo e propagação do parasita *in vitro* (CADORE et al., 2009), macrófagos e células esplênicas murinas. Foi verificado que em todos os tipos celulares estudados, o parasita Nc foi capaz de invadir e se proliferar no interior destas células.

As galectinas foram descobertas por se ligarem em glicanas na superfície de vírus, bactérias, protozoários e fungos (VASTA, 2009) e seu potencial papel como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) tornou-se uma área de grande atenção. A considerável diversidade do repertório de galectina em cada organismo e a grande variação na especificidade de cada galectina em relação às glicanas alvo, sugerem que elas sejam capazes de atuar reconhecendo estruturas *non-self* em

patógenos. Além disso, uma vez que as galectinas podem formar oligômeros, as suas propriedades de ligação multivalentes, incluindo avidéz aumentada, permitem que as galectinas participem eficazmente tanto no reconhecimento direto de patógenos, atuando como opsonina, neste caso fazendo o *cross-link* com células fagocíticas da resposta imune e facilitando a aproximação e fagocitose deste parasita (RABINOVICH; TOSCANO, 2009), quanto na modulação de respostas imunes inatas e adaptativas (RABINOVICH; GRUPPI, 2005; DHIRAPONG et al., 2009), como será discutido adiante. Ainda não está claro se o reconhecimento do patógeno pela galectina é um mecanismo de defesa eficaz, mas sabe-se que uma glicana específica na superfície de um microrganismo pode ser reconhecida por múltiplas galectinas e que o resultado da interação difere consideravelmente dependendo do tipo de galectina envolvida, da concentração da galectina na superfície celular particular e do microambiente extracelular. São estes aspectos que determinam a ativação antagonística ou sinérgica de vias de sinalização, como, por exemplo, modulação da resposta imunológica ou produção e secreção de citocinas (RABINOVICH et al., 2007; VASTA et al., 2012). As galectinas podem se ligar a um patógeno, auxiliar na interação inicial do microrganismo com células do hospedeiro, promovendo sua adesão, atuar em sinergismo com outras proteínas envolvidas no processo de invasão e facilitar a entrada na célula hospedeira ou a persistência da infecção (OUELLET et al., 2005; CHERNYI et al., 2011; VASTA, 2012). Assim, estes patógenos "subverteriam" os papéis das galectinas como PRRs, para se ligar ou ganhar entrada nas suas células. Há relatos também na literatura do papel da gal-1 expressa no epitélio cervical como receptor para o protozoário *T. vaginalis*, agindo na adesão e persistência do parasita na superfície de células epiteliais (OKUMURA; BAUM; JOHNSON, 2008).

Alguns estudos já evidenciaram a interação direta da gal-1 com a superfície de outros modelos celulares (DIAS-BARUFFI, 2003; LEPPÄNEN et al., 2005). Riul (2014) mostrou a interação direta da gal-1 com um protozoário de maneira CRD-dependente, ao usar formas tripomastigotas de *T. cruzi* como modelo celular. Porém, nosso estudo foi pioneiro em observar a interação da gal-1 com a superfície de *N. caninum*. Da mesma forma, observamos que esta interação depende da propriedade lectínica desta proteína. A gal-1 se liga à superfície de Nc via o reconhecimento de carboidratos na superfície do parasita, uma vez que foi observada a inibição da ligação na presença de lactose (Figura 7) e essa ligação ocorre de maneira dose-dependente (Figura 8).

Tem sido amplamente demonstrado que os carboidratos desempenham um papel crucial no processo de adesão/invasão e nas interações imunológicas entre parasita-hospedeiro (ZÚÑIGA et al., 2001; OKUMURA; BAUM; JOHNSON, 2008; VASTA, 2009, 2012; ALVES et al., 2010; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010; MARCHANT et al., 2012). Estudos evidenciaram que a maioria das glicoproteínas encontradas nos taquizoítas de *N. caninum* está associada à superfície do parasita (BASZLER et al., 1996; FUCHS et al., 1999). As modificações dos carboidratos da superfície dos taquizoítas, poderiam, portanto, influenciar as propriedades adesivas destes microrganismos. Nossa hipótese foi que, como a linhagem lacZ expressa a enzima β -galactosidase (Nc1-lacZ), o glicofenótipo desses taquizoítas poderia ser diferente da linhagem selvagem, podendo os sítios de ligação da gal-1 estarem com expressão alterada na superfície de Nc1-lacZ em relação a Nc1-selvagem. Essa diferente glicosilação poderia levar a padrões distintos de reconhecimento de glicanas pela galectina na superfície destas cepas (SATO et al., 2009; BERNARDI et al., 2015). Isso poderia ter implicações não só em relação às interações parasita-hospedeiro em nível celular, mas também com relação ao reconhecimento antigênico e possível consequência imunológica ao, por exemplo, mascarar epítomos peptídicos devido ao diferente perfil de glicosilação (FUCHS et al., 1999). Para isso, procedemos com o ensaio de *binding* por microscopia confocal e foi constatado que o padrão de fluorescência foi o mesmo entre as duas linhagens de Nc (Figuras 10 e 11), sugerindo que a ligação de gal-1 com taquizoítas de Nc ocorre de igual forma tanto para Nc1-selvagem quanto para Nc1-lacZ. O fato de não haver divergência entre os padrões de interação da gal-1 entre as duas cepas, nos permitiu utilizar a cepa Nc1-LacZ para os estudos de infecção experimental *in vivo*, considerando que a resposta observada possa ser extrapolada para a cepa Nc1-selvagem. Niehus e colaboradores (2014) compararam duas cepas de *T. gondii*, uma virulenta e outra não-virulenta, e verificaram que elas diferem no conteúdo de suas âncoras de GPI na superfície celular, sendo que a cepa avirulenta apresenta menor nível de N-glicosilação; porém, foi observado que este fato não interfere na capacidade de tais cepas estimularem uma resposta imune em macrófagos (NIEHUS et al., 2014).

As células de vertebrados possuem uma densa e complexa matriz de estruturas de glicanas, denominadas coletivamente glicocálix, compreendendo glicoproteínas e glicolípidos de membrana. As glicanas consistem em cadeias de moléculas de açúcar, que podem ser ramificadas e muitas vezes terminam numa unidade de açúcar

pertencente à classe dos ácidos siálicos. Evidências indicam que os sialoconjugados estão envolvidos na invasão de células hospedeiras pelos coccídeos (FRIEDRICH; MATTHEWS; SOLDATI-FAVRE, 2010). Um estudo envolvendo taquizoítas de *T. gondii* estabeleceu que a remoção de sialoglicoconjugados pelo tratamento das células hospedeiras com neuraminidase afetava drasticamente a invasão (MONTEIRO; SOARES; DE SOUZA, 1998; INNES; MATTSSON, 2007). Sabendo-se do possível envolvimento dos sialoconjugados no processo de invasão do patógeno e da capacidade destas galectinas se ligarem ao glicocálix de células hospedeiras, hipoteticamente sugerimos que estas galectinas poderiam, então, agir negativamente no processo invasivo do parasita. A galectina bloquearia a ligação inicial do parasita às células do hospedeiro (VASTA, 2012; VASTA et al., 2012), embora não haja dados na literatura envolvendo a interferência da galectina na invasão de parasitas apicomplexa. Assim, no sentido de investigar essa possível interferência no processo invasivo do Nc *in vitro*, foram realizados ensaios de invasão na presença gal-1 recombinante exógena em células VERO e macrófagos, os quais têm um importante papel no controle da infecção, gerando uma imunidade protetora inicial contra Nc (ABE et al., 2014) e foi observado que a interação gal-1-parasita ou gal-1-célula hospedeira não interfere no processo invasivo *in vitro* (Figuras 12 e 13).

5.2. Papel da gal-1 na resposta imune inata contra *N. caninum*

A resposta inflamatória é um processo crítico para a eliminação de patógenos, porém pode desencadear sérios efeitos deletérios ao hospedeiro. Identificar fatores endógenos que regulam a resposta imunológica é o objetivo principal no campo da imunologia (RABINOVICH et al., 2007). Após a constatação de que a gal-1 não estaria interferindo no processo de invasão do parasita, partimos para os estudos *in vivo*, para então investigarmos a participação da gal-1 endógena ou da recombinante humana exógena no processo de infecção experimental com Nc. Tratando de neosporose, bovinos são obviamente o alvo de investigação, porém, pela inviabilidade devido às condições experimentais com este modelo animal, camundongo tem sido considerado um modelo estratégico para a investigação inicial da infecção causada por Nc, mesmo com suas limitações (REICHEL; ELLIS, 2009).

O primeiro aspecto analisado na infecção experimental com Nc foi a carga parasitária no peritônio, em que foi possível notar o papel da gal-1 exógena na diminuição do número de taquizoítas, aos 5 dias de infecção (Figura 19A). Embora

não tenhamos observado a interferência da gal-1 no processo de invasão *in vitro*, uma explicação para tal fato é que a gal-1 interage fisicamente com os taquizoítas de Nc no meio extracelular. Assim, a gal-1 administrada diariamente estaria bloqueando a adesão desses parasitas, que são liberados das células hospedeiras após os primeiros ciclos replicativos, aos macrófagos residentes no peritônio (VASTA, 2012; VASTA et al., 2012), como já discutido nesse trabalho, diminuindo sua entrada nas células e retardando sua replicação. Por outro lado, há estudos que mostram que a galectina pode induzir a morte de alguns patógenos ao se ligar à superfície desse microrganismo (Kohatsu, 2006; Stowel, 2010). Assim, uma outra sugestão seria que ao interagir fisicamente com Nc, a galectina estaria levando esses taquizoítas à morte. Além disso, foi encontrada uma alta produção de óxido nítrico (NO) em camundongos selvagens ($WT^{gal-1+/+}$) aos 5 dias de infecção, a qual foi exacerbada com o tratamento com gal-1 exógena, o que pode ter contribuído também para a eliminação do parasita observada na cavidade peritoneal.

Aos 8 dias de infecção, observou-se uma significativa diminuição do número de taquizoítas peritoneais em animais infectados, que se tornou quase indetectável aos 15 dias de infecção (Figura 19). Tanto em camundongos $WT^{gal-1+/+}$ quanto camundongos destituídos do gene da gal-1 ($KO^{gal-1-/-}$), a gal-1 exógena exerceu um papel contrário aos 8 dias de infecção com relação à carga parasita intraperitoneal, elevando-a (Figura 19B). Entendemos que como já havia cessado o tratamento com gal-1 nesse período, não houve a interação física da gal-1 com o parasita levando à inibição da invasão ou à morte do taquizoíta, como discutido anteriormente. Além disso, a grande quantidade de NO produzido no início da infecção em animais $WT^{gal-1+/+}$ não se manteve nos outros períodos analisados (Figura 20). Assim, considera-se que o maior número de taquizoítas apresentado pelos animais $WT^{gal-1+/+}$ tratados com gal-1 aos 8 dias de infecção já esteja refletindo a ação sistêmica da galectina, que favorece um ambiente anti-inflamatório, como será discutido adiante.

Nos animais $KO^{gal-1-/-}$ a produção de NO foi bem mais eficiente que em animais $WT^{gal-1+/+}$ (cerca de 100 vezes maior). Ao adicionar a gal-1 exógena ocorre a redução da produção de NO, evidenciando o caráter imunomodulador dessa galectina (Figura 20B). A capacidade da gal-1 endógena gerar uma supressão natural dos mecanismos inflamatórios efetores estaria desfavorecendo a produção exacerbada de NO. Isso sugere que animais $KO^{gal-1-/-}$ eliminariam os taquizoítas mais eficientemente que os $WT^{gal-1+/+}$, uma vez que a gal-1 endógena criaria um ambiente favorável à replicação

do parasita, não apenas pela inibição da produção de NO local observada, mas por contribuir para a resolução da resposta inflamatória aguda no geral. Recentemente, foi demonstrado que a deficiência de gal-1 promove o aumento da concentração de NO no pulmão de camundongos infectados com *H. capsulatum*, se comparado ao grupo WT^{gal-1+/+} (RODRIGUES et al., 2016). Estes resultados estão em consonância com outros estudos que mostraram que a gal-1 modula negativamente a produção de NO por macrófagos ativados (CORREA et al., 2003).

Ainda com relação aos mecanismos envolvidos na resposta imune inata, é bem estabelecido que neutrófilos são rapidamente recrutados para o sítio infeccioso, onde auxiliam no *clearance* de patógenos, e logo são eliminados desses tecidos, por serem de vida curta (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Tal característica pode explicar o grande aumento da população de granulócitos (Ly6G+) no sítio inflamatório nos primeiros dias de infecção, observado no grupo WT^{gal-1+/+}, seguida da significativa diminuição do infiltrado neutrofílico após o 8º dia de infecção (Figura 21A). Macrófagos residentes nos tecidos agem como células sentinelas que iniciam o recrutamento de neutrófilos por induzir e controlar diversos processos, como o aumento da permeabilidade vascular local e liberação de quimiocinas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Os neutrófilos desempenham a função de eliminar microrganismos invasores através dos mecanismos de *burst* respiratório, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo complexo NADPH-oxidase e pela desgranulação com a liberação de enzimas citolíticas (VALKO et al., 2007). Relatos na literatura mostram que os neutrófilos são capazes de produzir certas citocinas, como IL-12 e TNF- α , quando em presença de antígenos de *T. gondii* (BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000). Além disso, foi descrito que camundongos depletados de neutrófilos infectados com *T. gondii* sucumbem durante a fase aguda da infecção (BLISS et al., 2001). Assim, é importante destacar que os neutrófilos desempenham papel crucial na infecção por *T. gondii*, através da produção de citocinas que direcionam para um perfil de resposta Th1 (DENKERS, 2003). Estudos *in vitro* conduzidos em células endoteliais vasculares umbilicais bovinas sugerem que a infecção com taquizoítas de *T. gondii* ou Nc desencadeiam uma cascata de reações pro-inflamatórias que levam ao aumento da adesão de polimorfonucleares neutrófilos, mediada pelo aumento da expressão dos genes das moléculas de adesão, como E-selectinas, VCAM-1 e ICAM-1 (TAUBERT et al., 2006). Além disso, recentemente foi sugerido que taquizoítas de Nc induzem a formação de NETs (*neutrophils extracellular traps*) por neutrófilos de

canídeos (WEI et al., 2016), o que já havia sido demonstrado para outros parasitas apicomplexa, como *Eimeria bovis* e *T. gondii* (BEHRENDT et al., 2010; REICHEL et al., 2015). Essas NETs, compostas principalmente por DNA, peptídeos antibacterianos e proteínas dos seus grânulos, foram reconhecidas como um novo mecanismo efetor de neutrófilos em muitos processos imunológicos, agindo como uma barreira física para microrganismos e evitando sua disseminação (NAUSEEF; BORREGAARD, 2014).

Com relação ao papel da gal-1 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, a gal-1 endógena pode agir dificultando a migração de células através do endotélio, pela sua capacidade de se ligar aos sítios de adesão dessas células de maneira competitiva (NORLING; PERRETTI; COOPER, 2009). Além disso, foi descrito que a gal-1 inibe o recrutamento de neutrófilo, podendo interferir tanto na quimiotaxia, no rolamento e na migração transendotelial destas células em inflamações experimentais (LA et al., 2003; STOWELL et al., 2007). Contrastando com a capacidade da gal-1 inibir o tráfego celular e modular a liberação de mediadores da inflamação aguda, estudos evidenciaram o papel dessa galectina na indução da migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. Sugere-se que esse efeito seja decorrente da ligação da gal-1 à sialoproteína CD43, uma das mais abundantes proteínas de superfície de neutrófilos (AUVYNET et al., 2013). Essa sialoproteína está relacionada com o recrutamento de neutrófilos, uma vez que estudos demonstraram que camundongos deficientes de CD43 apresentaram prejuízo no rolamento e na infiltração tecidual (WOODMAN et al., 1998). Além desta função da gal-1 na indução da migração de neutrófilos, há propostas de que ela exerça uma função pro-inflamatória, atuando no *burst* oxidativo de neutrófilos, no sentido de ativar a NADPH-oxidase (ALMKVIST et al., 2002). Assim, dependendo das condições do microambiente, a gal-1 pode exercer funções antagônicas sobre os neutrófilos: atuar como quimioatraente em ausência de sinais inflamatórios ou regular negativamente a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (AUVYNET et al., 2013). Em nosso estudo foi verificado um aumento exacerbado de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos infectados (tanto WT^{gal-1+/+} quanto KO^{gal-1-/-}) (Figura 21A). Vale destacar que KO^{gal-1-/-} infectados apresentaram uma maior migração de neutrófilos para o peritônio aos 8 dias de infecção, se comparado aos camundongos WT^{gal-1+/+}, mas nenhuma alteração foi observada ao tratar com gal-1 exógena.

A capacidade quimiotática da gal-1 não é exclusiva para neutrófilos, mas também já foi descrita para células dendríticas e monócitos/macrófagos (FULCHER et al., 2009; MALIK et al., 2009). É bem estabelecido na literatura que macrófagos e células dendríticas (DC) nos locais de infecção desempenham um papel importante na geração de imunidade protetora inicial contra Nc (DION et al., 2011; ABE et al., 2014). Sabe-se também que Nc produz moléculas particulares capazes de estimular a migração de células monocíticas para os locais de infecção, o que consequentemente aumenta a invasão e proliferação inicial do parasita (COURRET et al., 2006; SEIPEL et al., 2009). Uma vez invadidas, essas células podem migrar para os tecidos, longe dos locais de infecção, facilitando a disseminação do parasita em todo o hospedeiro (BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Em nosso estudo, a diminuição da porcentagem de macrófagos F4/80⁺MHCII⁺ observada na cavidade peritoneal em animais WT^{gal-1/+} e KO^{gal-1/-} (Figura 21B) sugerem, então, a dispersão desses macrófagos para os outros tecidos, deixando o foco de infecção. Além disso, uma explicação bastante plausível para a diminuição de macrófagos seria a morte dessas células por apoptose, induzida por IFN- γ . O efeito de IFN- γ sobre células infectadas com Nc foi investigado e verificou-se que essa citocina é capaz de diminuir a viabilidade de células infectadas e induzir a morte apoptótica das mesmas (NISHIKAWA et al., 2001b). Então, sabendo que os taquizoítas de Nc tem capacidade de invadir os macrófagos peritoneais e em nosso estudo foi identificado um aumento da produção de IFN- γ em animais infectados, que será discutido mais adiante, a hipótese de morte desses macrófagos torna-se válida.

Uma outra razão para a diminuição da porcentagem de macrófagos no sítio de infecção, que não pode ser descartada é relativa ao número total de células compreendidas na *gate* (Figura 5), abrangendo diferentes populações, tanto macrófagos como polimorfonucleares. Assim, em animais controle, temos apenas as células residentes (majoritariamente macrófagos) e após a infecção ocorre a grande migração de granulócitos para o sítio de infecção. Assim, é esperado que nos primeiros dias de infecção ocorra inversão da porcentagem de populações celulares. Esse fato é especialmente importante quando consideramos que o número de neutrófilos geralmente excede, e muito, o número de outros fagócitos, especialmente durante os primeiros estágios de uma inflamação aguda.

Macrófagos murinos infectados por Nc exibem maior ativação, com níveis de expressão aumentados de F4/80, CD40, CD80 e CD86, e produção de IL-6, IL-12p40

e IFN- γ (ABE et al., 2014). Em contrapartida, monócitos/macrófagos infectados com *T. gondii* não foram capazes de aumentar a expressão das moléculas co-estimuladoras, o que contribui para a propagação do parasita nas fases iniciais da infecção (SEIPEL et al., 2009). Em nosso estudo, não foi observado aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) nestas células (dados não apresentados). Esses fatos sustentam a ideia de que diferentes ambientes podem afetar de maneira distinta as células da linhagem monocítica, e que são esperados efeitos divergentes em resposta às infecções parasitárias (SEIPEL et al., 2009). Camundongos depletados de macrófagos apresentam susceptibilidade aumentada à infecção por Nc, indicando imunidade protetora contra Nc desempenhada por macrófagos, controlando os parasitas no local da infecção e a sobrevivência dos animais (ABE et al., 2014). Além disso, os níveis de expressão de MHCII aumentam em macrófagos após infecção *in vivo* por Nc, sugerindo que os macrófagos podem apresentar com eficiência antígenos do parasita via MHCII, gerando elevada proliferação de células T (NISHIKAWA et al., 2001b; DION et al., 2011). Nossos achados estão em concordância com estes pesquisadores, ao observarmos que macrófagos e células dendríticas provenientes da cavidade peritoneal de camundongos infectados com Nc apresentaram um aumento da expressão de MHCII em relação ao grupo não infectado, embora não significativo (Figura 22B). Ainda que tenha sido observada uma redução do número de macrófagos nos primeiros dias de infecção, houve a ativação destas células, que é essencial para a eficácia no controle da replicação do parasita.

Células apresentadoras de antígenos (APCs) são cruciais para o reconhecimento e controle precoce do parasita, distinguindo patógenos através de receptores Toll-like (TLR), para, subsequentemente, iniciarem a resposta adaptativa (VAN KOOYK; RABINOVICH, 2008). A estimulação de TLR induz respostas protetoras imediatas através da produção de diversos peptídeos antimicrobianos e citocinas. Mineo e seu grupo demonstraram que a via de reconhecimento TLR2/MyD88 é crítica para efetivamente estimular a resposta imune adaptativa e levar ao controle da proliferação do parasita durante as fases aguda e crônica da infecção (MINEO et al., 2009, 2010b). Porém em nosso estudo foi observada uma tendência à diminuição da expressão de TLR2 na superfície das APCs estudadas, a saber macrófagos e células dendríticas, embora não significativo (Figura 23).

Gal-1 parece contribuir para a resolução da resposta inflamatória aguda. Foi demonstrado que a administração de gal-1 exógena atenuou a inflamação em diversos modelos murinos de doença inflamatória (SCHNAAR, 2016). Em nosso trabalho foi observada uma diminuição da população de macrófagos F4/80⁺MHCII⁺ em camundongos KO^{gal-1/-} tratados com gal-1 exógena (Figura 21B), que possivelmente refletiu na diminuição da produção de NO, consequentemente, maior carga parasitária na cavidade peritoneal, aos 8 dias de infecção. Uma vez que a gal-1 dificulta a migração de fagócitos através do endotélio por competir com sítios de adesão dessas células, esperávamos que a ausência de gal-1 endógena (animais KO^{gal-1/-}) facilitasse a migração de macrófagos para o peritônio, mas a porcentagem de células encontradas em animais WT^{gal-1+/+} e KO^{gal-1/-} infectados com Nc foi parecida nesse período. Esse perfil de resposta mudou aos 15 dias; enquanto os diferentes grupos de animais WT^{gal-1+/+} apresentaram a mesma porcentagem de células F4/80⁺, nos animais KO^{gal-1/-} infectados houve uma queda na porcentagem de macrófagos peritoneais.

Apesar do papel tradicional das células dendríticas no direcionamento de respostas imunes, algumas células dendríticas convencionais podem agir atenuando a resposta inflamatória ao promover anergia de células T ou favorecer a expansão, diferenciação e recrutamento de células T regulatórias (Treg) (SAEI; HADJATI, 2013; BLIDNER et al., 2015). Vários estímulos podem influenciar no direcionamento de células dendríticas a se tornarem tolerogênicas durante uma inflamação, infecção ou dano tecidual (BLIDNER et al., 2015; PONCINI et al., 2015; THIEMANN et al., 2015). Fulcher e colaboradores demonstraram, em modelo *in vitro*, que a gal-1 pode influenciar o início da resposta imune adaptativa através da ativação da maturação e migração de células dendríticas pela matriz extracelular (FULCHER et al., 2006, 2009). Posteriormente, foi visto que células dendríticas que se diferenciam ou amadurecem em um microambiente rico em gal-1 adquire um perfil regulatório caracterizado por secreção abundante de IL-27 e IL-10. E ainda, quando transferidas *in vivo*, estas células promovem tolerância de células T antígeno-específicas e neoplásicas, atenuando respostas Th1 e Th17 e suprimindo a neuroinflamação autoimune (COOPER et al., 2010; ILARREGUI; RABINOVICH, 2010). Porém, em nosso estudo, não foi evidenciado efeito da gal-1 sobre a porcentagem de células dendríticas na cavidade peritoneal (Figura 21C).

5.3. Papel da gal-1 na resposta imune adaptativa contra *N. caninum*

A população de linfócitos T CD4⁺ produz citocinas pró- ou anti-inflamatórias que auxiliam na ativação ou recrutamento de outros tipos celulares (INNES et al., 2000, 2002) e já foi descrita na proteção contra a infecção por Nc (TANAKA et al., 2000b; CORREIA et al., 2013). O mesmo precursor (T CD4⁺ naive) pode se diferenciar em linfócitos T *helper* (Th) 1, Th2, Th17 ou T regulatória (Treg) dependendo das características das citocinas no microambiente (INNES et al., 2002; KELLY et al., 2005; INNES, 2007; FLYNN; MARSHALL, 2011; ZHANG et al., 2012). Células T desempenham um papel crucial na resposta imunológica contra Nc em hospedeiros murinos. A produção precoce de IFN- γ tem uma função primordial na multiplicação do parasita intracelular (ALMERÍA et al., 2012) e ativa uma resposta pró-inflamatória que induz a conversão do taquizoíta a bradizoíta e a manutenção dos cistos teciduais (WILLIAMS et al., 2009). Teixeira e colaboradores evidenciaram um aumento rápido das células produtoras de IFN- γ , o qual se mantém, em tecidos adiposos distintos de camundongos infectados com *N. caninum*. Após o desafio com o parasita, as células inatas, tais como NK, NK T, mas também os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ contribuíram para a produção de IFN- γ observada desde o primeiro dia da infecção (TEIXEIRA et al., 2016). IFN- γ é responsável por criar o ambiente de citocinas adequado para a ativação da resposta imune adaptativa Th1. É bem estabelecido na literatura, porém, que esse padrão de resposta Th1 está associado ao comprometimento da viabilidade do feto, um dos principais problemas da neosporose; assim, a manutenção da prenhez depende de uma mudança para uma resposta imune de tipo Th2 na interface materno-fetal, a fim de permitir a permanência do feto (QUINN; MILLER; ELLIS, 2004; INNES et al., 2005).

Grande parte dos linfócitos T CD8⁺ exerce função citotóxica, responsável por combater células infectadas por microrganismos intracelulares, como é o caso em Nc (OYKHMANN; MODY, 2010), mas estas células também desempenham papel na produção de citocinas (CORREIA et al., 2015). A produção de IFN- γ por células TCD8⁺ é um mecanismo protetor imprescindível na infecção por Nc, tanto em modelos murinos quanto bovinos (CORREIA et al., 2013, 2015). É importante destacar em nosso trabalho a alta produção de IFN- γ por células T CD8⁺ em animais WT^{gal-1/+} infectados com Nc, que foi bem maior que a produção dessa citocina por células T CD4⁺ (Figuras 28 e 29), tanto em número de células produtoras de IFN- γ (que triplicou aos 15 dias de infecção) quanto mediana de intensidade de fluorescência por célula.

Ao abordar o papel sistêmico da gal-1, dados consistentes na literatura demonstram que essa lectina é um regulador negativo do sistema imune, em virtude do seu efeito pró-apoptótico em células T helper pró-inflamatórias, da síntese de IL-10 e da modulação para um padrão Th2 de resposta (BLOIS et al., 2007, 2015; TOSCANO et al., 2007a; CEDENO-LAURENT; DIMITROFF, 2012; SCHNAAR, 2016). Células Th1 e Th17 efectoras expressam um repertório de glicanas de superfície celular que são específicas para a ligação de gal-1 e subsequente morte celular. Ao contrário, células Th2 são resistentes ao reconhecimento pela gal-1 devido à diferente sialilação de glicoconjugados da superfície destas células (TOSCANO et al., 2007a). Em nosso trabalho, observamos uma diminuição significativa da população de células TCD4⁺ e também uma aparente diminuição de células TCD8⁺ esplênicas (Figura 24), embora não significativo, em camundongos KO^{gal-1/-} tratados com gal-1 exógena, sugerindo o possível papel regulador da gal-1 através do seu efeito pró-apoptótico em células T ativadas, tanto no grupo controle (CT) quanto infectado (IT). Com os camundongos WT^{gal-1+/+} não foi possível verificar diferença, já que havendo a produção de gal-1 endógena, a suplementação com gal-1 exógena é pouco efetiva, o que já foi observado, uma vez que camundongos destituídos do gene da gal-1 desenvolvem melhor resposta dos padrões inflamatórios Th1 e Th17, se comparado com o animal WT^{gal-1+/+} (TOSCANO et al., 2007a). Assim, gal-1 é fundamental para a produção de citocinas anti-inflamatórias, inibindo respostas inflamatórias pela modulação do balanço Th1-Th2, através da indução de apoptose nas células T e por facilitar a expansão de células Treg secretoras de IL-10 (VAN DER LEIJ et al., 2004; BLOIS et al., 2007; VAN KOOYK; RABINOVICH, 2008).

Recentemente foi reportado que camundongos KO^{gal-1/-} infectados com *T. cruzi* são resistentes à infecção se comparados com o grupo WT^{gal-1+/+}. Sugere-se que esse fenótipo esteja associado à uma disfunção nas propriedades reguladoras devido à falta de gal-1, seguida pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , e exacerbação de respostas Th1 e TCD8⁺ (PONCINI et al., 2015). Em nosso trabalho, em conformidade com o que vem sendo descrito na literatura, a suplementação com gal-1 exerceu um papel na diminuição da produção e secreção de IFN- γ em animais KO^{gal-1/-} infectados, aos 8 dias de infecção (Figuras 28, 29 e 30). Outro dado importante é que os camundongos KO apresentaram menor número de células T produtoras de IFN- γ se comparado com os animais WT^{gal-1+/+} nesse período. Esses eventos indicam uma imunomodulação por gal-1 endógena, desfavorecendo a

exacerbação da resposta inflamatória inicial. Em camundongos $WT^{gal-1+/+}$, não foi observada diferença na produção de $IFN-\gamma$ por células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ pela suplementação com gal-1. Com a presença de gal-1 endógena, que atua na homeostase imunológica, naturalmente a resposta frente à infecção já estaria refletindo essa modulação, sendo pouco efetiva a suplementação com gal-1 exógena. Em camundongos $KO^{gal-1-/-}$, em contrapartida, que não têm “ajuste” natural da resposta imunológica, a suplementação com gal-1 exógena rendeu uma diferença expressiva.

A citocina IL-10 exibe uma potente atividade imunossupressora, inibindo a ativação de células T e a secreção de citocinas do padrão Th1, além de inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias em APC (BUTLER; HARRIS; BLADER, 2013). A ação da IL-10 também resulta na regulação negativa de MHCII e moléculas co-estimulatórias na superfície de macrófagos, além de suprimir a produção de NO e intermediários de nitrogênio por tais células (CYKTOR; TURNER, 2011; MINGOMATAJ; BAKIRI, 2016). Análises proteômicas e transcriptômicas evidenciaram que a gal-1 está intimamente relacionada ao efeito imunossupressor das Treg, sendo significativamente expressa e secretada por tais células (GARIN et al., 2007). Especula-se que outros mecanismos regulatórios possam estar envolvidos na supressão da resposta adaptativa mediada pela gal-1, uma vez que foi demonstrado que células Treg ($CD4^+CD25^+$) de camundongos destituídos de gal-1 endógena exibiram um comportamento imunossupressor comprometido e que a gal-1, por si só, é capaz de induzir a expressão de FoxP3 em células T naives. Além disso, embora camundongos $WT^{gal-1+/+}$ e $KO^{gal-1-/-}$ tenham apresentado um número de Treg similares, o potencial supressor *ex vivo* é comprometido (GARIN et al., 2007).

A infecção com Nc não elicitou uma maior produção de IL-10 por células T $CD4^+$ e $CD8^+$ do baço, porém, foi observado um aumento da produção dessa citocina bastante pronunciado em animais $KO^{gal-1-/-}$ infectados tratados com gal-1 aos 8 dias de infecção (Figura 31). Embora os animais infectados sem suplementação de gal-1 exógena não tenham apresentado aumento no número de células produtoras de IL-10, houve um aumento no nível de secreção de IL-10 para o meio extracelular (Figura 32). Nossa hipótese, nesse sentido, é que embora o número de células produtoras de IL-10 não tenha sido expressivo, estas células estavam pré-ativadas no grupo infectado, levando à maior produção de IL-10 frente a um segundo estímulo (Con-A ou extrato de Nc). Assim, a infecção serviu para primar tais células *in vivo*, deixando-as mais responsivas frente a um segundo estímulo.

A IL-4 é uma citocina do padrão Th2 que atua como reguladora negativa de padrões inflamatórios de resposta. Na infecção por Nc a presença dessa citocina pode inibir o desenvolvimento de resistência à infecção por Nc, mesmo na presença de IFN- γ . Foi observado que células esplênicas de camundongos resistentes à infecção mostraram uma alta razão IFN- γ /IL-4 na produção de citocinas, enquanto uma baixa razão IFN- γ /IL-4 foi associada à suscetibilidade à infecção (LONG; BASZLER; MATHISON, 1998). Em contrapartida, em modelos de prenhez bovina com infecção por Nc, a razão IFN- γ /IL-4 no sangue periférico foi associada ao sucesso na gestação (DARWICH et al., 2016). Foi observada também resposta imune mediada por células, caracterizada pela produção de IL-4 e decréscimo da produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α (QUINN; MILLER; ELLIS, 2004). Provavelmente, esses níveis de IL-4 foram produzidos visando restabelecer o balanço do sistema imune, uma vez que a infecção direcionou ao padrão Th1 de resposta. Anticorpos anti-IL-4 injetados em camundongos concomitante à dose de Nc, previamente à prenhez, reduziram a transmissão do parasita para o feto (LONG; BASZLER, 2000). Além disso, um padrão Th2 de citocinas, como IL-4 e IL-10, está associado com a manutenção de uma prenhez viável (QUINN et al., 2002b; ALMERIA et al., 2016; DARWICH et al., 2016). Em nosso estudo foi observada uma regulação positiva da secreção desta citocina por células esplênicas pela gal-1, no período inicial da infecção (Figura 33), reforçando os dados da literatura que afirmam que a gal-1 é fundamental para a produção de citocinas anti-inflamatórias e modulação do balanço Th1-Th2.

Gal-1 atua na secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- α por células dendríticas, desempenhando um importante papel na defesa inata contra infecções virais (LEVRONEY et al., 2005). Repetidamente, têm sido descritas as propriedades anti-inflamatórias da gal-1 para inúmeras células; assim, parece paradoxal sugerir que a gal-1 exerça uma atividade imunoestimuladora em células dendríticas (FULCHER et al., 2006). Entretanto, Cardoso e colaboradores (2012) têm estudado o papel imunoestimulatório e protetor de inúmeras lectinas de origem vegetal em resposta ao desafio com Nc e observaram que lectinas ligantes de D-galactose estimularam a produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12 em modelos experimentais de infecção por Nc (CARDOSO et al., 2012). Aqui neste trabalho, foi observado um efeito estimulatório da suplementação com gal-1 exógena sobre secreção de IL-6, tanto em animais WT^{gal-1+/+} quanto KO^{gal-1/-} (Figura 34). Porém, gal-1 endógena inibe a secreção de IL-6, uma vez que células esplênicas provenientes

de grupos controles $WT^{gal-1+/+}$ secretaram menor nível de IL-6 que $KO^{gal-1-/-}$. Assim como as evidências na literatura para a gal-1, em especial à produção de IL-6, nosso resultado também foi paradoxal. A IL-6 é uma citocina chave para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória do tipo Th17 (ZHANG et al., 2012), responsável pela rápida indução da resposta neutrofílica no início da infecção, demonstrado em modelo de infecção com *T. gondii* (KELLY et al., 2005). Assim, é importante destacar que, devido ao caráter imunomodulador da gal-1, esperávamos mesmo visualizar o efeito inibidor da inflamação pela gal-1 endógena. Nossa hipótese para esse evento contraditório é que, embora a gal-1 endógena tenha evidenciado sua propriedade anti-inflamatória, que pode estar refletindo em outras células do sistema imune secretoras de IL-6, a gal-1 exógena provavelmente exerceu uma atividade imunoestimulatória na secreção de IL-6 por células dendríticas, em consonância com Levroney e colaboradores (2005).

Em nosso trabalho, observamos o envolvimento das células B na infecção por Nc, através do aumento do número de células CD19⁺ (Figura 25) e maior expressão de MCHII nestas células. Um outro dado observado foi uma aparente regulação positiva na expressão de MHCII em células CD19⁺ ocasionada pela gal-1 endógena (Figura 26), sugerindo um papel desta lectina na ativação de células B. Relatos na literatura demonstram que a gal-1 é expressa em células B ativadas, mas não em células B em repouso (ZUÑIGA et al., 2001), o que sugere a participação dessa gal-1 na ativação de tais células. Além disso, Arginot e colaboradores (2013) demonstraram que a gal-1 está envolvida na diferenciação de células B imaturas na medula óssea (ANGINOT et al., 2013). Estes dados, juntamente com os resultados por nós observados, evidenciam a importância dos linfócitos B na resposta contra Nc e reafirmam a participação da gal-1 na ativação destas células.

Em bovinos, uma intensa resposta humoral foi observada, tanto em infecções naturais quanto em vacinação com taquizoítas inativados ou lisados (WILLIAMS et al., 2007), corroborando com outros trabalhos que demonstraram também a produção de IgM específica de Nc na primeira semana de infecção, seguida de IgG (BASZLER; MCELWAIN; MATHISON, 2000; TEIXEIRA et al., 2005). Estes anticorpos exercem um papel no controle da propagação do parasita, neutralizando os taquizoítas no estágio extracelular e reduzindo a invasão das células do hospedeiro (INNES et al., 2002, 2005; HALDORSON et al., 2006). Nossos resultados mostraram um estímulo da produção de IgG e IgM específicos para Nc nas primeiras semanas de infecção

(nos dois períodos analisados, 8 e 15 dias) em camundongos WT^{gal-1+/+} (Figura 27). Para as duas imunoglobulinas, a suplementação com gal-1 exógena elicitou o mesmo padrão de resposta, estimulando a secreção de imunoglobulinas em animais infectados, aos 15 dias de infecção. Ao assumirmos que a gal-1 é expressa em células B ativadas, mas não em células B em repouso, e que essa expressão é regulada positivamente pelo *cross-linking* do receptor de células B (BCR) com a molécula co-estimulatória CD40 (ZUÑIGA et al., 2001), podemos sugerir que a gal-1 atua na ativação de células B, mais precisamente, após esta reconhecer o antígeno. Assim, em animais infectados, houve maior produção de imunoglobulinas em decorrência da suplementação com gal-1.

5.4. Considerações Finais

É bem estabelecido que a imunidade protetora contra Nc deve ter um padrão de resposta Th1 não exacerbado (REICHEL; ELLIS, 2009), visando evitar danos ao hospedeiro e à prenhez. Nosso trabalho confirmou a grande versatilidade e importância da gal-1 endógena na manutenção da homeostase imunológica, por modular a imunidade inata e adaptativa, através de sua capacidade de se ligar em glicanas tanto na superfície das células em que são produzidas, quanto de outras células no microambiente em que se encontram ou ainda em glicanas da matriz extracelular (SCHNAAR, 2016). Corroborando com os resultados apresentados na literatura em geral, foi possível evidenciar um papel imunorregulatório da gal-1 também frente à infecção com Nc, a saber, diminuição da população de macrófagos peritoneais e inibição da produção de NO por estas células, diminuição da população de células T esplênicas, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e estímulo da produção de citocinas relacionadas ao padrão Th2 de resposta. É importante destacar que estes efeitos dependem de múltiplos parâmetros, incluindo o tipo celular envolvido, o perfil de ativação de células-alvo, o microambiente em que a gal-1 se encontra, bem como a concentração desta lectina (RABINOVICH et al., 2002; TOSCANO et al., 2007b).

Nosso trabalho é pioneiro no estudo da interação da gal-1 na infecção com Nc, iniciando a investigação dos mecanismos imunológicos envolvidos nesse processo e abrindo a porta para inúmeros estudos complementares que elucidarão melhor tais mecanismos. Como tal, é necessário que essa linha de investigação seja mantida e conduzida em modelos murinos de prenhez, que, por esboçarem mais de perto o

grande problema da neosporose, sejam passíveis de extrapolar para modelos bovinos. Apesar de ser um estudo básico, podemos vislumbrar um futuro promissor para a gal-1 na modulação da resposta imunológica contra uma infecção natural com *N. caninum*, principalmente em fazendas com surto de infecção por *N. caninum*, servindo como uma possível terapia adjuvante para a manutenção da gestação em prenhez ameaçada.

Conclusões

6. Conclusões

- A galectina-1 se liga de maneira específica e dose-dependente aos taquizoítas de Nc1-lacZ e não interfere no processo invasivo de *N. caninum*;
- Nc1-lacZ é capaz de estimular resposta imune em hospedeiro murino;
- A galectina-1 endógena medeia perfis imunológicos da resposta do hospedeiro, inibindo mecanismos efetores da resposta inata e estimulando a resposta adaptativa contra o parasita *N. caninum*;
- A galectina-1 exógena, em animais selvagens, promove o controle do parasita nos primeiros dias de infecção, por estimular uma resposta inflamatória contra o parasita;
- A suplementação com galectina-1 exógena, na ausência de galectina-1 endógena, gera imunorregulação direcionada para o padrão não inflamatório na resposta do hospedeiro contra o parasita *N. caninum*.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- ABE, C. et al. Macrophage depletion prior to *Neospora caninum* infection results in severe neosporosis in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 8, p. 1185–1188, 2014.
- ABE, C. et al. Role of the chemokine receptor CCR5-dependent host defense system in *Neospora caninum* infections. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 5, 2015.
- ALMERIA, S. et al. Cytokine gene expression in aborting and non-aborting dams and in their foetuses after experimental infection with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p. 138–142, 2016.
- ALMERÍA, S. et al. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3–4, p. 304–311, 2010.
- ALMERÍA, S. et al. Cytokine gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from *Neospora caninum* naturally infected dams throughout gestation. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 237–243, 2012.
- ALMERÍA, S. et al. Maternal and fetal immune response patterns in heifers experimentally infected with *Neospora caninum* in the second trimester of pregnancy - A descriptive study. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 146–152, 2014.
- ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 303–309, 2013.
- ALMERÍA, S.; LÓPEZ-GATIUS, F. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 169–175, jun. 2015.
- ALMKVIST, J. et al. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 8, p. 4034–4041, 2002.
- ALVES, C. M. O. S. et al. Galectin-3 plays a modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 475–485, 2010.
- 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. 3, p. 1–10, 2013.
- ANDRIANARIVO, A. G. et al. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. **Parasitology Research**, v. 96, n. 1, p. 24–31, 2005.
- ANGINOT, A. et al. Galectin 1 modulates plasma cell homeostasis and regulates the humoral immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 11, p. 5526–33, 2013.
- AUVYNET, C. et al. Galectin-1 promotes human neutrophil migration. **Glycobiology**, v. 23, n. 1, p. 32–42, 2013.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426–430, 2003.
- BARRIENTOS, G. et al. Involvement of galectin-1 in reproduction: Past, present and

future. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 2, p. 175–193, 2014.

BASZLER, T. V. et al. Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1635–1646, 1999.

BASZLER, T. V. et al. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1423–8, 1996.

BASZLER, T. V.; MCELWAIN, T. F.; MATHISON, B. A. Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 6, p. 893–8, 2000.

BAUM, L. G. et al. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. **Clinical Immunology**, v. 109, n. 3, p. 295–307, 2003.

BEHRENDT, J. H. et al. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133, n. 1, p. 1–8, 2010.

BENATAR, A. F. et al. Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1-23, 2015.

BERNARDI, A. et al. Europe PMC Funders Group Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents †. v. 42, n. 11, p. 4709–4727, 2015.

BJERKAS, I.; MOHN, F.; PRESTHUS, J. *Parasitenkunde*. p. 271–274, 1984.

BLIDNER, A. G. et al. Re-wiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions. **FEBS Letters**, v. 589, n. 22, p. 3407–3418, 2015.

BLISS, S. K. et al. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4898–4905, 2001.

BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Rapid Recruitment of Neutrophils Containing Prestored IL-12 During Microbial Infection. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 8, p. 4515–4521, 2000.

BLOIS, S. M. et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. **Nature medicine**, v. 13, n. 12, p. 1450–1457, 2007.

BLOIS, S. M. et al. Galectins in angiogenesis : consequences for gestation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 108, p. 33–41, 2015.

BOYSEN, P. et al. The Protozoan *Neospora caninum* Directly Triggers Bovine NK Cells To Produce Gamma Interferon and To Kill Infected Fibroblasts The Protozoan *Neospora caninum* Directly Triggers Bovine NK Cells To Produce Gamma Interferon and To Kill Infected Fibroblasts. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 953–960, 2006.

BUTLER, N. S.; HARRIS, T. H.; BLADER, I. J. Regulation of immunopathogenesis during Plasmodium and Toxoplasma infections: more parallels than distinctions? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 12, p. 593–602, dez. 2013.

CADORE, G. C. et al. Suscetibilidade de linhagens celulares e cultivos primários ao

Neospora caninum. **Ciência Rural**, v. 3939, n. 55, p. 1581–1585, 2009.

CARDOSO, M. R. D. et al. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 1–13, 2012.

CAZAROTTO, C. J. et al. Horses seropositive for *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora* spp.: Possible risk factors for infection in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 30–35, 2016.

CEDENO-LAURENT, F.; DIMITROFF, C. J. Galectin-1 research in T cell immunity: Past, present and future. **Clinical Immunology**, v. 142, n. 2, p. 107–116, 2012.

CHATTERJEE, A. et al. Anti-retroviral lectins have modest effects on adherence of *Trichomonas vaginalis* to epithelial cells *in vitro* and on recovery of *Trichomonas* fetus in a mouse vaginal model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–15, 2015.

CHERNYY, E. S. et al. Galectins promote the interaction of influenza virus with its target cell. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 76, n. 8, p. 958–967, 2011.

COOPER, D. et al. Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of Galectin-1. Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. **Methods in Enzymology**, v. 480, p. 199–244, 2010.

COOPER, D. et al. The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: Sweet or sour? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1253, n. 1, p. 181–192, 2012.

CORREA, S. G. et al. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, v. 13, n. 2, p. 119–128, 2003.

CORREIA, A. et al. Mucosal and systemic T cell response in mice intragastrically infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1–13, 2013.

CORREIA, A. et al. Predominant role of interferon-gamma in the host protective effect of CD8(+) T cells against *Neospora caninum* infection. **Scientific reports**, v. 5, n. October, p. 14913, 2015.

COURRET, N. et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309–316, 2006.

CYKTOR, J. C.; TURNER, J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 8, p. 2964–2973, 2011.

DARWICH, L. et al. Maternal and foetal cytokine production in dams naturally and experimentally infected with *Neospora caninum* on gestation day 110. **Research in Veterinary Science**, v. 107, p. 55–61, 2016.

DEÁK, M. et al. Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. **Immunobiology**, v. 220, n. 4, p. 483–489, 2015.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 43, p. 32744–32750, 2010.

- DENKERS, E. Y. From cells to signaling cascades: Manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 193–203, 2003.
- DHIRAPONG, A. et al. The immunological potential of galectin-1 and -3. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 5, p. 360–363, 2009.
- DIAS-BARUFFI, M. et al. Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without Inducing Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41282–41293, 2003.
- DIAS-BARUFFI, M. et al. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. **Glycobiology**, v. 20, n. 5, p. 507–520, 2010.
- DIAS-BARUFFI, M. et al. Method for increasing embryo implantation rate in mother's uterus in mammals, use of an effective amount of beta-galactoside-binding lectin or derivatives and product. US 20140057858, 27 fev. 2014.
- DIJKSTRA, T. et al. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 3–4, p. 161–169, 2003.
- DION, S. et al. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 685–695, 2011.
- 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, n. 2, p. 216–238, 2015.
- DUBEY. *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2003.
- DUBEY, J. P. et al. *Neospora caninum*- associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. **J Vet Diagn Invest**, v. 69, p. 66–69, 1990.
- DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 929–946, 2002.
- DUBEY, J. P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 382–387, 2011.
- DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 267–289, 2006.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 645–671, 2006.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1–2, 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, n. 2, p. 323–367, 2007.
- EPERON, S. et al. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora*

caninum infection. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 5, p. 225–236, 1999.

FERNANDES, B. C. T. M. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais - Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 1–2, p. 33–40, 2004.

FICHOROVA, R. N. NIH Public Access. v. 83, p. 185–189, 2010.

FICHOROVA, R. N. et al. Trichomonas vaginalis lipophosphoglycan exploits binding to galectin-1 and -3 to modulate epithelial immunity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 2, p. 998–1013, 2016.

FLYNN, R. J.; MARSHALL, E. S. Parasite limiting macrophages promote IL-17 secretion in naive bovine CD4⁺ T-cells during *Neospora caninum* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 3–4, p. 423–429, 2011.

FRENKEL, J. K.; SMITH, D. D. Determination of the genera of cyst-forming coccidia. **Parasitology Research**, v. 91, n. 5, p. 384–389, 2003.

FRIEDRICH, N.; MATTHEWS, S.; SOLDATI-FAVRE, D. Sialic acids: Key determinants for invasion by the Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 10, p. 1145–1154, 2010.

FUCHS, N. et al. Detection of surface-associated and intracellular glycoconjugates and glycoproteins in *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1597–1611, 1999.

FUJII, T. U. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 331–334, 2001.

FULCHER, J. A. et al. Galectin-1-Matured Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Have Enhanced Migration through Extracellular Matrix. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 216–226, 2006.

FULCHER, J. A. et al. Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through syk and protein kinase C signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26860–26870, 2009.

GARIN, M. I. et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2058–2065, 2007.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 169–171, 2005.

GENNARI, S. M. et al. Prevalence of antibodies against *Neospora* spp. and *Sarcocystis neurona* in donkeys from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 109–111, mar. 2016.

GONDIM, L. F. P. et al. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 1–7, 2001.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 159–161, 2004.

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, n. 1, p. 133–150, 2013.

GUIMARÃES, J. S. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1–2, p. 1–8, 2004.

GUY, C. S. et al. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. **The Veterinary record**, v. 149, n. 15, p. 443–449, 2001.

HALDORSON, G. J. et al. *Neospora caninum*: Antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 112, n. 3, p. 172–178, 2006.

HALL, C. A.; REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora* abortions in dairy cattle: Diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 3–4, p. 231–241, 2005.

HEMPHILL, A. The Host -Parasite Relationship in Neosporosis. **Advances in Parasitology**, v. 43, p. 47–104, 1999.

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, n. 3, p. 245–259, 2016.

ILARREGUI, J. M.; RABINOVICH, G. A. Tolerogenic dendritic cells in the control of autoimmune neuroinflammation: An emerging role of protein-glycan interactions. **NeuroImmunoModulation**, v. 17, n. 3, p. 157–160, 2010.

INNES, E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 13, p. 1903–1910, 2007.

INNES, E. A. et al. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. 1, p. 95–100, 1995.

INNES, E. A. et al. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 0, p. 93–101, 2000.

INNES, E. A. et al. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497–504, 2002.

INNES, E. A. et al. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 29–36, 2005.

INNES, E. A.; MATTSSON, J. G. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 43–44, 2007.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 10, p. 987–995, 2004.

JANKOVIC, D. et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 2, p. 273–283, 2007.

JOSUÉ PIRES, T. et al. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in goats in Santa Catarina state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p. 360–366, 2014.

KAMILI, N. A. et al. Key regulators of galectin-glycan interactions. **PROTEOMICS**, p.

1–26, set. 2016.

KELLY, M. N. et al. Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Response against *Toxoplasma gondii* Infection Interleukin-17/Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Re. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 617–621, 2005.

KHAN, I. A. et al. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. **Experimental parasitology**, v. 85, n. 1, p. 24–34, 1997.

KIM, L. et al. p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 7, p. 4178–84, 2005.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945–950, 2010.

KLEVAR, S. et al. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 3–4, p. 329–339, 2007.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013.

LA, M. et al. A Novel Biological Activity for Galectin-1. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1505–1515, out. 2003.

LEPPÄNEN, A. et al. Dimeric galectin-1 binds with high affinity to α 2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5549–5562, 2005.

LEPPANEN, A. et al. Examination of Whole Cell Galectin Binding by Solid Phase and Flow Cytometric Analysis. In: STOWELL, S. R.; CUMMINGS, R.D. **Galectins: methods and protocols**. Atlanta: Humana Press, 2015, 91-104.

LEVRONEY, E. L. et al. Novel Innate Immune Functions for Galectin-1: Galectin-1 Inhibits Cell Fusion by Nipah Virus Envelope Glycoproteins and Augments Dendritic Cell Secretion of Proinflammatory Cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 413–420, 2005.

LIU, C.-H. et al. Cutting Edge: Dendritic Cells Are Essential for *In Vivo* IL-12 Production and Development of Resistance against *Toxoplasma gondii* Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 1, p. 31–35, 2006.

LIU, F. SHORT ANALYTICAL REVIEW Galectins : A New Family of Regulators of Inflammation 1. v. 97, n. 2, p. 79–88, 2000.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins: Regulators of acute and chronic inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, p. 158–182, 2010.

LONG, M. T.; BASZLER, T. V. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. **J Immunol**, v. 164, p. 4768–4774, 2000.

LONG, M. T.; BASZLER, T. V.; MATHISON, B. A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. **The Journal of parasitology**, v. 84, n. 2, p. 316–20, 1998.

- MALIK, R. K. J. et al. Galectin-1 stimulates monocyte chemotaxis via the p44/42 MAP kinase pathway and a pertussis toxin-sensitive pathway. **Glycobiology**, v. 19, n. 12, p. 1402–1407, 2009.
- MARCHANT, J. et al. Galactose recognition by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 20, p. 16720–16733, 2012.
- MCALLISTER, M. M. et al. Rapid communication. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1473–1479, set. 1998.
- MCALLISTER, M. M. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443–463, 2016.
- MERCIER, S. et al. Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 121–129, 2008.
- MINEO, T. W. P. et al. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Research**, v. 40, n. 4, 2009.
- MINEO T. W. P. et al. *Neospora caninum* excreted/secreted antigens trigger CC-chemokine receptor 5-dependent cell migration. **Int J Parasitol**, v. 40, p. 797-805, 2010a.
- 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, n. 8, p. 825–833, 2010b.
- MINGOMATAJ, E.; BAKIRI, A. H. Regulator Versus Effector Paradigm: Interleukin-10 as Indicator of the Switching Response. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 50, n. 1, p. 97–113, 2016.
- MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: What can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 52–70, 2014.
- MONTEIRO, V. G.; SOARES, C. P.; DE SOUZA, W. Host cell surface sialic acid residues are involved on the process of penetration of *Toxoplasma gondii* into mammalian cells. **FEMS Microbiol Lett**, v. 164, n. 2, p. 323–327, 1998.
- MORAES, L. M. DE B. et al. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 312–317, dez. 2011.
- MOTA, C. M. et al. *Neospora caninum* Activates p38 MAPK as an Evasion Mechanism against Innate Immunity. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. September, p. 1456, 2016.
- MUELLER, A.; STRANGE, P. G. The chemokine receptor, CCR5. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 35–38, 2004.
- MÜLLER, J. et al. *In vitro* culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 115–124, 2013.
- NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 602–11, 2014.
- NIEHUS, S. et al. Virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii* which differ in their glycosylphosphatidylinositol content induce similar biological functions in macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- NIO-KOBAYASHI, J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-

binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. **Anatomical Science International**, p. 1–12, 2016.

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, n. 4, p. 811–6, 2001a.

NISHIKAWA, Y. et al. Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 123, p. 25–31, 2001b.

NISHIKAWA, Y. et al. Roles of CD122+ cells in resistance against *Neospora caninum* infection in a murine model. **The Journal of veterinary medical science**, v. 72, n. 10, p. 1275–1282, 2010.

NORLING, L. V.; PERRETTI, M.; COOPER, D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. **Journal of Endocrinology**, v. 201, n. 2, p. 169–184, 2009.

OKUMURA, C. Y. M.; BAUM, L. G.; JOHNSON, P. J. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2078–2090, out. 2008.

OUELLET, M. et al. Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, p. 4120–4126, 2005.

OYKHMANN, P.; MODY, C. H. Direct Microbicidal Activity of Cytotoxic T-Lymphocytes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, n. C, p. 1–9, 2010.

PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P. The chloramphenicol acetyltransferase vector as a tool for stable tagging of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 196, n. 2, p. 75–81, 2014.

PÉREZ, C. V. et al. Dual roles of endogenous and exogenous galectin-1 in the control of testicular immunopathology. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12259, 2015.

PERONE, M. J. et al. Dendritic Cells Expressing Transgenic Galectin-1 Delay Onset of Autoimmune Diabetes in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 8, p. 5278–5289, 2006.

PONCINI, C. V. et al. Trypanosoma cruzi Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1–Dependent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 195, p. 3311–3324, 2015.

QUINN, H. E. et al. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. **The Journal of parasitology**, v. 88, n. 4, p. 691–6, 2002a.

QUINN, H. E. et al. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy?, **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 391–394, 2002b.

QUINN, H. E.; MILLER, C. M. D.; ELLIS, J. T. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 723–732, 2004.

RABINOVICH, G. A. et al. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: Novel regulators of innate and adaptive immune responses. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7–9, p. 565–573, 2002.

- RABINOVICH, G. A. et al. An emerging role for galectins in tuning the immune response: Lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 143–158, 2007.
- RABINOVICH, G. A.; GRUPPI, A. Galectins as immunoregulators during infectious processes: From microbial invasion to the resolution of the disease. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 4, p. 103–114, 2005.
- RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M. A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1572, n. 2–3, p. 274–284, 2002.
- RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 5, p. 338–352, 2009.
- RAIMUNDO, J. M. et al. Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* in dogs from the state of Tocantins: serology and associated factors. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 475–481, 2015.
- RAMOS, I. A. DE S. et al. Assessment of transplacental transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle in the Agreste region of Pernambuco. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2961, n. ahead, 2016.
- RAPOPORT, E. M.; BOVIN, N. V. Specificity of Human Galectins on Cell Surfaces. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 80, n. 7, p. 846–56, 2015.
- REGIDOR-CERRILLO, J. et al. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: How the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 1–15, 2014.
- REICHEL, M. et al. Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 50, n. 2, p. 106–115, 2015.
- REICHEL, M. P. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133–142, 2013.
- REICHEL, M. P. et al. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1455–1470, 2014.
- REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T. *Neospora caninum* - How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 11, p. 1173–1187, 2009.
- RIUL, T. B. Avaliação da participação da galectina-1 na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- RIUL, T. B. Envolvimento da galectina-1 na infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*. 2014. 116f. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- RODRIGUES, L. C. et al. Protective Effect of Galectin-1 during *Histoplasma capsulatum* Infection Is Associated with Prostaglandin E 2 and Nitric Oxide Modulation.

Mediators of Inflammation, v. 2016, p. 1–13, 2016.

ROSBOTTOM, A. et al. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

SAEI, A.; HADJATI, J. Tolerogenic dendritic cells: Key regulators of peripheral tolerance in health and disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 161, n. 4, p. 293–303, 2013.

SANTUCCI, L. et al. Galectin-1 Exerts Immunomodulatory and Protective Effects on Concanavalin A – Induced Hepatitis in Mice. **Hepatology**, p. 399–406, 2000.

SANTUCCI, L. et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1381–1394, 2003.

SATO, S. et al. Galectins in innate immunity: Dual functions of host soluble ??-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 172–187, 2009.

SCHNAAR, R. L. Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. June, p. 1–14, 2016.

SEIPEL, D. et al. Monocytes/macrophages infected with *Toxoplasma gondii* do not increase co-stimulatory molecules while maintaining their migratory ability. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 9, p. 672–80, set. 2009.

SHAAPAN, R. M. The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. **Journal of Parasitic Diseases**, 2015.

STASKA, L. M. et al. *Neospora caninum*-Infected Cattle Develop Parasite-Specific CD4+ Cytotoxic T Lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3272–3279, 2003.

STOWELL, S. R. et al. Human galectin-1,-2, and-4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 219–227, 2007.

STOWELL, S. R. et al. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **Journal of immunology**, v. 180, n. 5, p. 3091–3102, 2008.

STOWELL, S. R. et al. Galectin-1 Induces Reversible Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 5, p. 1408–1418, 14 jan. 2009.

STROHBUSCH, M. et al. *Neospora caninum* and bone marrow-derived dendritic cells: Parasite survival, proliferation, and induction of cytokine expression. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 7, p. 366–372, 2009.

TANAKA, T. et al. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. **Parasitology research**, v. 86, n. 9, p. 768–771, 2000a.

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, 2000b.

- TAUBERT, A. et al. Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 272–283, 2006.
- TEIXEIRA, L. et al. Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. **Immunology**, v. 116, n. 1, p. 38–52, 2005.
- TEIXEIRA, L. et al. Plasmacytoid and conventional dendritic cells are early producers of IL-12 in *Neospora caninum*-infected mice. **Immunology and cell biology**, v. 88, n. 1, p. 79–86, 2010.
- TEIXEIRA, L. et al. Enrichment of IFN- γ producing cells in different murine adipose tissue depots upon infection with an apicomplexan parasite. **Scientific reports**, v. 6, n. March, p. 23475, 2016.
- THIEMANN, S. et al. Galectin-1 regulates tissue exit of specific dendritic cell populations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 37, p. 22662–22667, 2015.
- TOLEDO, K. A. et al. Galectin-1 Exerts Inhibitory Effects during DENV-1 Infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112474, 13 nov. 2014.
- TOSCANO, M. A et al. Galectin-1 Suppresses Autoimmune Retinal Disease by Promoting Concomitant Th2- and T Regulatory-Mediated Anti-Inflammatory Responses. **The Journal of Immunology**, n. 22, 2006.
- TOSCANO, M. A et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature immunology**, v. 8, n. 8, p. 825–834, 2007a.
- TOSCANO, M. A. et al. Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: Glycan-binding proteins with cytokine-like activity? **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 1–2, p. 57–71, 2007b.
- TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and Toxoplasma gondii. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 558–561, 2005.
- UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 9, p. 712–725, 2006.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VAN DER LEIJ, J. et al. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: An important tool in the regulation of the immune response. **Journal of Pathology**, v. 204, n. 5, p. 511–518, 2004.
- VAN KOOYK, Y.; RABINOVICH, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. **Nature immunology**, v. 9, n. 6, p. 593–601, 2008.
- VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 424–438, 2009.
- VASTA, G. R. Galectins as Pattern Recognition Receptors: Structure, Function, and Evolution. In: LAMBRIS, J. D.; HAJISHENGALLIS, G. (Eds.). . **Advances in**

experimental medicine and biology. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2012. v. 946p. 21–36.

VASTA, G. R. et al. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: An unresolved paradox. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUL, p. 1–14, 2012.

VESPA, G. N. et al. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. **Journal of immunology**, v. 162, n. 2, p. 799–806, 1999.

VONLAUFEN, N. et al. Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum* tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 1253–1265, 2002.

WEI, Z. et al. Canine Neutrophil Extracellular Traps Release Induced by the Apicomplexan Parasite *Neospora caninum* *In Vitro*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. October, 2016.

WHITNEY, P. L.; POWELL, J. T.; SANFORD, G. L. Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. **The Biochemical journal**, v. 238, n. 3, p. 683–689, 1986.

WILLIAMS, D. J. 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.

WILLIAMS, D. J. L. et al. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1343–1348, 2007.

WILLIAMS, D. J. L. et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1895–1900, 2009.

WOODMAN, R. C. et al. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 11, p. 2181–2186, 1998.

YAI, L. E. O. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 94, n. 3, p. 766, 2008.

YAMANE, I. et al. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 62, n. 3, p. 347–51, 2000.

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 10, n. July 2015, p. e17, 2008.

ZHANG, H. et al. The Treg/Th17 Imbalance in *Toxoplasma gondii*-Infected Pregnant Mice. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 2, p. 112–121, 2012.

ZUÑIGA, E. et al. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 1, p. 73–79,

2001.

ZÚÑIGA, E. et al. Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: Modulation of microbicidal activity and survival. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6804–6812, 2001.

Anexo I: Parecer do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 11.1.1279.53.2), intitulado "Função da galectina-1 na resistência do hospedeiro contra a infecção experimental por *Neospora caninum*", de autoria de **Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira e Ana Patrícia Yatsuda Natsui**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 26/05/2014.

Colaboradores: Marcelo Dias Baruffi; Carla de Agostino Biella

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1279.53.2), entitled: "Função da galectina-1 na resistência do hospedeiro contra a infecção experimental por *Neospora caninum*" by de **Isabel Cristina Costa Vigato Ferreira and Ana Patrícia Yatsuda Natsui** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, May, 26 2014.

Duração prevista do projeto: 28/05/2014 a 15/03/2017

Ribeirão Preto, 28 de Maio de 2014.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA

João Fernando Velho de Andrade Diniz
Secretário da CEUA