



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**Efeito adjuvante e potencial imunoestimulador das lectinas de  
*Artocarpus integrifolia* (KM<sup>+</sup> e Jacalina) e *Synadenium  
carinatum* (ScLL) na imunização de camundongos contra  
*Neospora caninum***

**Mariana de Resende Damas Cardoso**

**Uberlândia - Minas Gerais**

**Fevereiro-2011**

**Mariana de Resende Damas Cardoso**

**Efeito adjuvante e potencial imunoestimulador das lectinas de  
*Artocarpus integrifolia* (KM<sup>+</sup> e Jacalina) e *Synadenium  
carinatum* (ScLL) na imunização de camundongos contra  
*Neospora caninum***

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como requisito para  
obtenção de título de Mestre

**Orientadora: Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva**

**Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo**

**Uberlândia - Minas Gerais**

**Fevereiro-2011**



*Dedicatória*

*Aos meus pais,*

**Mônica e Claudio**, pelo amor, carinho e dedicação que sempre me ofereceram; por me aconselharem a sempre ir além; por toda lágrima chorada junto e por todas as orações que me acompanharam...

*A minha irmã,*

**Carolina**, por ser minha melhor amiga e escutar sempre aquilo que eu tinha para dizer; por rir o meu riso e chorar o meu pranto; por viver o que eu vivo mesmo distante...

*Ao meu irmão,*

**Pedro**, por ser a alegria da nossa casa; por me fazer mais feliz desde que nasceu!

*A minha Mãe do Céu,*

**Maria**... Nas suas mãos maternas deixo tudo o que fiz e vou fazer... Deixo tudo que fui e serei... "Totus tuus ego sum"

"A fé e a razão (fides et ratio) constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. Foi Deus quem colocou no coração do homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de O conhecer a Ele, para que, conhecendo-O e amando-O, possa chegar também à verdade plena sobre si próprio " (Papa João Paulo II)



*Agradecimientos*

*À Deus*, pelo dom da vida; por não me deixar sozinha em nenhum momento; por me ensinar a ter paciência e coragem; por estar mais perto do que imagino; por me perdoar nos meus vários momentos de fraqueza; por me enviar anjos e santos para me acompanharem; por ser fiel e cumprir Suas promessas; por recolher minhas lágrimas e não deixar que elas caiam em vão; por conduzir meus passos e enxergar além, até onde ainda não consigo ir; por me abraçar e me tomar no colo em todos os momentos que peço e também naqueles que não sou nem digna para pedir...

*À minha família*, por ser sempre meu porto seguro...

*À prof. Dra. Deise*, por todo o aprendizado... Por me ensinar não apenas a lidar com os animais, mas também a tratá-los com o respeito que lhes é devido; por me ensinar não apenas a trabalhar na bancada, mas também a "arrumar a casa" depois do serviço; por me ensinar não apenas a cuidar das células da cultura, mas também a responsabilidade de cuidar de um "filho" que tem suas exigências e não pode esperar nem um fim de semana; por me ensinar não apenas a ter ética e ser uma profissional mais do que exemplar, mas também a não deixar de ser mulher, mãe, avó, amiga, por causa disso...

*Ao prof. Dr. Tiago*, meu co-orientador, por toda ajuda no trabalho, por toda ideia sugerida, pelo apoio sempre concedido e pelos momentos de descontração...

*Ao prof. Dr. José Roberto*, por me aceitar em seu laboratório no terceiro período de Ciências Biológicas, quando eu nem sabia ainda o que era imunologia; pelo voto de confiança demonstrado nos inúmeros momentos de aprendizagem...

À prof, Dra. Neide, pela ajuda nas técnicas e análises histológicas, pelo apoio concedido, pelo carinho e amizade oferecidas...

Aos anjos que Deus colocou no meu caminho, **Caroline**, por sua amizade dentro do laboratório, por sua enorme ajuda no meu trabalho, pelos momentos de sufoco e de alívio, por me fazer sorrir quando tudo parecia sem solução, por ter cuidado do "Bolinha" comigo... **Dâmaso**, por tudo que já me ensinou, pela dedicação que sempre teve ao me ajudar, pela vida compartilhada por tanto tempo...

Aos colegas de laboratório, **Cristina, Fernanda S., Arlindo, Murilo, Celene, Polyana, Letícia, Everton, Álvaro, Hercílio, Fernanda P., Maraysa**, pela alegria compartilhada, pelos trabalhos que realizamos juntos, por toda conversa, por toda ajuda e companheirismo...

Ao pessoal da histologia, **Mariana, Angélica, Bellisa, Loyane e Paulo Victor** pelos almoços compartilhados e por toda a ajuda oferecida...

Ao pessoal do laboratório da alergia, **Laura, Leandro, Izabela, Ana Carolina, Fernando**, pela ajuda e cumplicidade...

À dona **Zilda**, por ser exemplo de profissional dedicada, à **Ana Cláudia**, por me ajudar nos momentos em que eu precisava, ao **Márley**, pelos momentos de descontração, ao **Máx**, pela disponibilidade...



Aos meus amigos e colegas de sala, **Ester**, **Zé** (Henrique), **Priscila**, **Silas**, pelos desabafos, por toda a ajuda nas pequenas e grandes coisas, pelas lágrimas compartilhadas, pelas confidências...

Aos meus grandes amigos e amigas, **Ester**, **Mônica**, **Luanda**, **Pablo**, **Rosiane**, pelos segredos, pela dedicação, pelo carinho, pelas brigas e reconciliações, pelos conselhos, pela força... **Paulo**, **Tânia**, **Liliane**, **Marilda**, **Neverson**, **Fábio** e **Glenda**, por me fazerem sentir mais perto do Céu e me trazerem esperança quando tudo parece perdido...

**Aos animais**, que doaram suas vidas, sedo nosso objeto de estudo, e possibilitaram a realização desse trabalho...

Às agências financiadoras **CAPES**, **CNPq** e **FAPEMIG** pelo apoio financeiro...

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABTS: 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline

ACF: antígeno completo de Freund

AIF: antígeno incompleto de Freund

APC: célula apresentadora de antígeno

BBS: solução salina tamponada com borato

BCA: ácido bicinconínico

BSA: soroalbumina bovina

CD28: cluster of differentiation 28

CD4+: cluster of differentiation 4+

CD8+: cluster of differentiation 8+

CEBEA: Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

CEUA: Comitê de Ética para Utilização de Animais

ConA: concanavalina A

CRD: domínio de reconhecimento de carboidrato

DAB: 3,3'- tetrahidrocloro de diaminobenzidina

DNA: ácido desoxirribonucléico

DO: densidade óptica

d.p.i.: dias pós-imunização

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GalNAc: N-acetil galactosamina

GRA-1: proteína 1 de grânulo denso

GRA-2: proteína 2 de grânulo denso

GRA-7: proteína 7 de grânulo denso

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IFN- $\gamma$ : interferon gama

IL-10: Interleucina-10

IL-5: interleucina 5

IL-6: interleucina 6

IL-12: interleucina 12

IL-15: interleucina 15

ISCOMS: complexos imunoestimulantes

JAC: jacalina

kDa: kiloDaltons

MIC-1: proteína 1 de micronema

MIC-2: proteína 2 de micronema

MIC-3: proteína 3 de micronema

MIC-4: proteína 4 de micronema

MVP: membrana do vacúolo parasitóforo

PHA: fitohemaglutinina

PBS: solução salina tamponada com fosfatos

PBS-T: solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20

PCR: reação em cadeia da polimerase

Rf- mobilidade relativa

RIFI: reação de imunofluorescência indireta

ROP-1: proteína 1 de roptria

ROP-2: proteína 2 de roptria

RRPs: receptores de reconhecimento padrão

ScLL: lectina do látex de *Synadenium carinatum*

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SLA: antígeno solúvel de *Leishmania*

SNC: sistema nervoso central

TCR: receptor de célula T

TMB: tetrametilbenzidina

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TNP: trinitrofenil

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

USP: Universidade de São Paulo

VP: vacúolo parasitóforo

WGA: aglutinina do germe do trigo

A decorative L-shaped line consisting of a vertical segment on the left and a horizontal segment extending to the right, both in black. The horizontal segment is positioned below the word 'Sumário'.

*Sumário*

## RESUMO

## ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Parasito.....	21
1.1.2 Hospedeiros intermediários e definitivos.....	21
1.1.3 Ciclo biológico e transmissão.....	22
1.1.4 Patogênese.....	24
1.1.5 Resposta imune.....	25
1.1.6 Sinais clínicos.....	27
1.1.7 Epidemiologia e prevalência.....	28
1.1.8 Controle.....	28
1.2 Lectinas como adjuvantes e imunomoduladores.....	30
1.2.1 Lectinas KM <sup>+</sup> e Jacalina ( <i>Artocarpus integrifolia</i> ).....	32
1.2.2 Lectina ScLL ( <i>Synadenium carinatum</i> ).....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Geral.....	37
3.2 Específicos.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Obtenção de parasitos.....	39
4.2 Preparação do antígeno solúvel de lisado total de <i>N. caninum</i> .....	39
4.3 Preparação dos taquizoítas para reação de imunofluorescência indireta.....	40
4.4 Lectinas de <i>Artocarpus integrifolia</i> (KM <sup>+</sup> e Jacalina) e <i>Synadenium carinatum</i> (ScLL).....	40

4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
4.5 Animais e imunização.....	42
4.6 Avaliação da resposta imune humoral.....	43
4.6.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgG e subclasses anti- <i>N. caninum</i> .....	43
4.6.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para IgG anti- <i>N. caninum</i> .....	44
4.6.3 <i>Immunoblot</i> .....	44
4.7 Avaliação da resposta imune celular: análise de citocinas.....	45
4.8 Desafio.....	46
4.9 PCR em tempo real.....	47
4.10 Análises histopatológica e imunohistoquímica.....	47
4.11 Análise estatística.....	48
4.12 Normas de biossegurança e manipulação de animais.....	49
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Homogeneidade e pureza das lectinas KM <sup>+</sup> , Jacalina e ScLL.....	51
5.2 Resposta imune humoral após imunização e desafio com <i>N. caninum</i> .....	52
5.3 Resposta imune celular: produção de citocinas.....	61
5.4 Morbidade e mortalidade após desafio com <i>N. caninum</i> .....	65
5.5 Carga parasitária cerebral.....	69
5.6 Análise histopatológica.....	73
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXO 1.....	95



*Resumo*



## RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam especificamente a carboidratos e possuem importantes papéis na modulação da resposta imune.  $KM^+$  e Jacalina (JAC) são lectinas da semente da jaca (*Artocarpus integrifolia*) e ScLL é uma lectina do látex da planta *Synadenium carinatum*. *Neospora caninum* é um parasito do filo Apicomplexa que causa doença neuromuscular em cães e desordens reprodutivas em bovinos, causando sério impacto econômico na indústria agropecuária. O papel imunoestimulador de lectinas de plantas tem sido investigado em diversas infecções parasitárias, mas não na neosporose. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito adjuvante e o potencial imunoestimulador de  $KM^+$ , JAC e ScLL na imunização de camundongos contra a neosporose. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados subcutaneamente por três vezes, em intervalos de quinze dias, com o antígeno de lisado total de *Neospora* (NLA) associado com as lectinas (grupos NLA+ $KM$ , NLA+JAC, NLA+ScLL), NLA somente, lectinas somente ( $KM$ , JAC e ScLL), além do grupo PBS (controle da infecção). Os animais foram desafiados com isolado Nc-1 ( $2 \times 10^7$  taquizoítas) e avaliados quanto aos escores de morbidade, mortalidade, resposta imune humoral específica, produção de citocinas por células do baço, carga parasitária cerebral e lesões histopatológicas. Resultados sorológicos demonstraram maiores níveis de IgG anti *N. caninum* produzidos pelos animais dos grupos NLA+ $KM$  e NLA+ScLL que NLA+JAC e NLA somente. O grupo NLA+ $KM$  induziu maiores níveis do isotipo IgG2a, enquanto NLA+ScLL induziu maiores níveis do isotipo IgG1. Em todos os grupos, a resposta de IgG1 foi maior do que de IgG2a antes e após o desafio, porém a razão IgG2a/IgG1 aumentou após o desafio nos grupos NLA+ $KM$ , NLA+ScLL e  $KM$ . A produção de citocinas após o estímulo antigênico *in vitro* demonstrou que NLA+ $KM$  induziu altos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, apresentando a maior razão IFN- $\gamma$ /IL-10, seguido pelo grupo NLA+ScLL, indicando um padrão de resposta imune direcionado ao perfil Th1. NLA+JAC induziu baixos níveis destas citocinas e menor razão IFN- $\gamma$ /IL-10 em relação aos demais grupos, indicando um padrão de resposta imune do tipo Th2. Após o desafio com o parasito, camundongos do grupo NLA+ $KM$  apresentaram a maior sobrevida com baixa carga parasitária cerebral e moderada inflamação tecidual, enquanto animais imunizados com NLA+ScLL apresentaram sobrevida intermediária com baixa carga parasitária cerebral e baixos escores de morbidade e inflamação. O grupo NLA+JAC exibiu sobrevida intermediária, mas com alta carga parasitária cerebral e suave inflamação. Em conclusão, as lectinas  $KM^+$  e ScLL mostraram ser adjuvantes satisfatórios por aumentar a imunogenicidade do NLA e apresentaram efeito imunoestimulador por conferir proteção parcial dos camundongos imunizados e desafiados com dose letal de *N. caninum*, enquanto a lectina Jacalina não produziu efeito adjuvante suficiente na imunização contra a neosporose.

**Palavras-chave:** *Neospora caninum*, imunização, lectinas,  $KM^+$ , Jacalina, ScLL

## ABSTRACT

Lectins are proteins that bind specifically to carbohydrates and have important role in modulation of the immune response.  $KM^+$  and Jacalin (JAC) are lectins from the seeds from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) and ScLL is a lectin from the *Synadenium carinatum* latex. *Neospora caninum* is an apicomplexan parasite that causes neuromuscular disease in dogs and reproductive disorders in cattle, with serious economic impact on the livestock industry. The immunestimulatory role of plant lectins has been investigated in several parasitic infections, but not in neosporosis. This study aimed to evaluate the adjuvant effect and the immunestimulatory potential of  $KM^+$ , JAC and ScLL in immunization of mice against neosporosis. C57BL 6 mouse groups were subcutaneously immunized three times at 15-day intervals with *Neospora* lysate antigen (NLA) associated with lectins (NLA+ $KM^+$ , NLA+JAC and NLA+ScLL groups), NLA alone, lectins alone ( $KM^+$ , JAC and ScLL groups), and PBS group (infection control). Animals were challenged with Nc-1 isolate ( $2 \times 10^7$  tachyzoites) and evaluated for morbidity, mortality, specific antibody response, cytokine production by spleen cells, cerebral parasite burden and histopathological lesions. Serological assays demonstrated higher levels of IgG to *N. caninum* for NLA+ $KM^+$  and NLA+ScLL than NLA+JAC and NLA groups. NLA+ $KM^+$  group induced higher levels of IgG2a isotype whereas NLA+ScLL induced higher levels of IgG1 isotype. In all groups, IgG1 response was higher than IgG2a response before and after challenge, but the IgG2a/IgG1 ratio increased after challenge in NLA+ $KM^+$ , NLA+ScLL and  $KM^+$  groups. Cytokine production after *in vitro* antigenic stimulation showed that NLA+ $KM^+$  induced high levels of IFN- $\gamma$  and IL-10, presenting the highest IFN- $\gamma$ /IL-10 ratio, followed by NLA+ScLL group, indicating a pattern of immune response toward Th1 type. NLA+JAC induced low levels of these cytokines and the lowest IFN- $\gamma$ /IL-10 ratio in relation to other groups, indicating a profile of Th2 type immune response. After parasite challenge, NLA+ $KM^+$  mice showed the highest survival with low brain parasite burden and moderate tissue inflammation, whereas NLA+ScLL mice presented intermediate survival with low brain parasite burden and low scores of morbidity and inflammation. NLA+JAC group exhibited intermediate survival, but with the highest brain parasite burden and mild inflammation. In conclusion,  $KM^+$  and ScLL lectins showed suitable adjuvant effect by increasing NLA immunogenicity and immunostimulatory role by conferring partial protection of mice immunized and challenged with lethal dose of *N. caninum*, while the JAC lectin showed no adequate adjuvant effect in the immunization against neosporosis.

**Keywords:** *Neospora caninum*, immunization, lectins,  $KM^+$ , Jacalin, ScLL



*Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Parasito

*Neospora caninum* é um parasito protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, estreitamente relacionado ao protozoário *Toxoplasma gondii*, que tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, por causar doença neuromuscular em cães e aborto em bovinos em todo o mundo (DUBEY, 2003; REICHEL; ELLIS, 2009).

Historicamente, *N. caninum* foi reconhecido em 1984 na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos, mas soronegativos para *T. gondii* (BJÈRKAS; MOHN; PRESTHUS, 1984). Mais tarde, em um estudo retrospectivo, Dubey e colaboradores (1988a) encontraram um parasito semelhante em tecido cerebral de cães com doença fatal sugestiva de toxoplasmose, mas três características diferenciavam do quadro de toxoplasmose: (1) paralisia predominante dos membros posteriores; (2) cistos teciduais com paredes espessas (1-4 µm) e restritos a tecidos neurais; (3) testes sorológicos e imunohistoquímicos negativos para *T. gondii*. Assim, um novo gênero *Neospora* e espécie *Neospora caninum* foram propostos para este novo protozoário e, logo após a sua descrição, *N. caninum* foi isolado em cultura celular a partir de cistos teciduais de cães com infecção congênita (DUBEY et al., 1988b) e identificado em bovinos como causa de aborto (THILSTED; DUBEY, 1989).

### 1.1.2 Hospedeiros intermediários e definitivos

*N. caninum* está amplamente distribuído em muitos animais, embora até o presente momento, cause doença clínica importante apenas em bovinos e cães. Infecção natural por *N. caninum*, evidenciada pelo isolamento do parasito, já foi demonstrada também em outros animais domésticos (carneiros, cabras, cavalos e búfalos) e exposição ao parasito, evidenciada pela detecção de anticorpos específicos, tem sido relatada em várias espécies de animais silvestres (raposas, coiotes, lobos, veados, alpacas e camelos) (DUBEY, 2003). Infecções experimentais têm sido realizadas com êxito em bovinos, cães, carneiros, cabras, porcos, gatos, camundongos, gerbis, macacos e pombos (DUBEY et al., 2002).

Outros possíveis hospedeiros intermediários de *N. caninum* são os humanos, levantando a questão sobre o seu potencial zoonótico. Embora não haja relatos

comprovados sobre a infecção por *N. caninum* em humanos (GRAHAM et al., 1999; PETERSEN et al., 1999), evidências sorológicas de exposição ao parasito foram demonstradas em diferentes populações humanas (NAM; KANG; CHOI, 1998; TRANAS et al., 1999). Além disso, já foi demonstrada uma maior soropositividade a *N. caninum* em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e com distúrbios neurológicos quando comparado a indivíduos saudáveis, aludindo novas questões sobre o papel de *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos (LOBATO et al., 2006).

A estreita relação de *N. caninum* com *T. gondii* levou a uma suspeita inicial de um hospedeiro definitivo carnívoro para *N. caninum*. Além disso, estudos epidemiológicos indicavam uma associação entre a presença de cães e o risco de aborto ou infecções neonatais por *N. caninum* em bovinos (PARÉ et al., 1998; WOUUDA et al., 1999). Em 1998, após 10 anos de sua descrição, foi descoberto o seu hospedeiro definitivo, pela demonstração de oocistos nas fezes de cães alimentados com cistos teciduais de camundongos experimentalmente infectados (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY; DUBEY; DUNCAN, 1999). Coiotes (*Canis latrans*) foram considerados como um hospedeiro definitivo adicional de *N. caninum* (GONDIM et al., 2004) e é possível que outros canídeos silvestres possam exercer o papel de hospedeiros definitivos para o parasito.

Mais recentemente, foi demonstrado que cães eliminam oocistos nas fezes após alimentação com ovos embrionados de galinhas inoculados com taquizoítas de *N. caninum*, levantando a questão que as aves podem participar como reservatórios do parasito (FURUTA et al., 2007). Em seguida, galinhas (*Gallus domesticus*) foram confirmadas como hospedeiros naturais do parasito (COSTA et al., 2008). Estes achados têm grande importância epidemiológica, uma vez que as galinhas são cosmopolitas e fontes de alimento para outras espécies de animais, incluindo os cães.

### **1.1.3 Ciclo biológico e transmissão**

Assim como acontece com outros protozoários do filo Apicomplexa, *N. caninum* possui um ciclo de vida heteroxeno. A fase assexuada ocorre em hospedeiros intermediários herbívoros ou onívoros (aves e mamíferos domésticos e silvestres), enquanto a fase sexuada é limitada a hospedeiros definitivos canídeos (cão e coiote) (GONDIM et al., 2004). O ciclo envolve três formas infecciosas, como ocorre em *T.*

*gondii*: taquizoítas (livres ou em grupos), bradizoítas (em cistos teciduais) e esporozoítas (em oocistos), sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão do parasito.

Os taquizoítas causam forte resposta inflamatória com destruição de tecidos e são responsáveis pela manifestação clínica da doença (fase aguda). Para sobreviver em condições fisiológicas e imunológicas, *N. caninum* desenvolveu um conjunto de mecanismos reguladores que direcionam várias respostas adaptativas. O parasito utiliza a conversão de taquizoítas para bradizoítas como um processo adaptativo para lidar com o ambiente hostil dentro do hospedeiro e assegurar sua continuidade na natureza (EASTICK; ELSHEIKHA, 2010). Bradizoítas se multiplicam lentamente por endodiogenia e vão formar os cistos teciduais intracelulares, predominantemente em tecidos neurais, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (fase crônica). Quando os cistos são ingeridos por hospedeiros definitivos, bradizoítas são liberados, invadem células epiteliais do intestino delgado e culminam com o desenvolvimento da fase sexuada (gamogonia) com produção final de oocistos não esporulados (imaturos ou não infecciosos) que são eliminados com as fezes. No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados. Após a ingestão de oocistos esporulados por hospedeiros intermediários, os esporozoítas são liberados no trato digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, multiplicando-se como taquizoítas que disseminam por todo o organismo. Após alguns ciclos de multiplicação, taquizoítas dão origem a bradizoítas e formam novos cistos teciduais (DUBEY, 2003).

Dessa forma, a transmissão horizontal pode ocorrer pela ingestão de cistos teciduais (cérebro, medula espinhal, coração e músculos) ou pela ingestão de oocistos, através de água ou alimento contaminados (DUBEY, 2003). Outras rotas secundárias de transmissão horizontal como lactogênica, venérea ou inseminação artificial têm sido investigadas. A possibilidade de transmissão lactogênica de *N. caninum* foi sugerida após a demonstração de infecção oral em bezerros recém-nascidos de vacas soronegativas através de colostro artificialmente contaminado com taquizoítas (UGGLA et al., 1998) e pela detecção de DNA do parasito no colostro e leite de vacas soropositivas (MOSKWA et al., 2007), mas até o presente momento, não há evidências de que esta transmissão ocorra naturalmente.

A presença de DNA do parasito em sêmen de touros com infecção naturalmente adquirida (ORTEGA-MORA et al., 2003) sugere a possibilidade de transmissão

venérea, mas o seu real papel na transmissão da neosporose bovina precisa ainda ser determinado. A inoculação intra-uterina de sêmen contaminado com taquizoítas de *N. caninum* em novilhas resultou em infecção materna e número reduzido de embriões viáveis, embora DNA do parasito não tenha sido detectado em nenhum embrião (SERRANO et al., 2006). Entretanto, vacas inseminadas após congelamento e descongelamento de sêmen contaminado com taquizoítas do parasito falharam em adquirir a infecção (CANADA et al., 2006).

A transmissão da neosporose por transferência de embriões parece também ser pouco provável, uma vez que a transferência de embriões de doador soropositivo em receptor soronegativo resultou em feto negativo para *N. caninum*, enquanto a transferência de embriões de doador soronegativo para receptor soropositivo resultou em infecção fetal (BAILLARGEON et al., 2001).

A transmissão vertical ainda parece ser o principal modo de transmissão em bovinos. O parasito é transmitido da mãe para o feto via placenta durante sucessivas gestações, devido ao desequilíbrio da resposta imune causado pelas citocinas regulatórias do feto como IL-10 e IL-4, que levam a recrudescência e diferenciação de bradizoítas em taquizoítas com subsequente parasitemia (QUINN; MILLER; ELLIS, 2004). Assim, a transmissão transplacentária contribui significativamente para a persistência da infecção no rebanho, sendo a frequência relativa com que ela ocorre é crítica para abordagem de medidas de controle da neosporose bovina (WILLIAMS; TREES, 2006).

#### **1.1.4 Patogênese**

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

A primeira etapa é caracterizada pela adesão inicial do parasito à célula hospedeira e ocorre sem qualquer orientação do parasito, envolvendo antígenos de superfície imunodominantes (NcSAG1 e NcSRS2). Após a adesão inicial, os parasitos reorientam-

se, posicionando a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas de micronemas (MIC1, 2, 3 e 4) são secretadas e funcionam como adesinas, sendo responsáveis pela espessa zona de adesão e junção de forma irreversível. Após a formação desta junção, inicia-se o movimento da junção ao redor do taquizoíta, que juntamente com o citoesqueleto (sistema de actina-miosina) do parasito, força-o para dentro do VP, culminando com a invasão. A membrana plasmática do hospedeiro é também usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos.

A segunda etapa é caracterizada pela secreção de proteínas de roptrias (ROP1 e 2), que são liberadas dentro do VP e estendem a MVP para formar associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático são posicionados adjacentes ao VP.

Na última etapa, proteínas de grânulos densos (GRA-1, 2 e 7) modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento do parasito.

Os taquizoítas dentro do VP proliferam por endodiogenia, produzindo novos parasitos em poucos dias após a infecção e, subsequentemente, há lise da célula hospedeira e liberação dos taquizoítas que ficam livres para infectar uma variedade de tecidos e tipos celulares (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 1999).

### **1.1.5 Resposta imune**

Tanto a resposta imune inata como a resposta adaptativa participam dos mecanismos protetores contra *N. caninum*, semelhantemente aos mecanismos descritos para o parasito estreitamente relacionado *T. gondii* (BUZONI-GATEL et al., 2006). A primeira barreira física é representada pelos enterócitos e as espessas junções intercelulares da mucosa intestinal que tentam deter a invasão do parasito pela via oral. Quando enterócitos são infectados eles podem secretar moléculas citotóxicas como o óxido nítrico (NO), citocinas (IL-15) que ativam células *natural killer* (NK) para produzir IFN- $\gamma$ , e quimiocinas que recrutam leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células dendríticas. Estas células recrutadas, quando estimuladas pelo parasito, secretam IL-12 que ativa as células NK e células T CD4<sup>+</sup>, induzindo a diferenciação para a subpopulação Th1 produtora de IFN- $\gamma$ , que por sua vez, ativa os macrófagos,



células dendríticas e enterócitos que vão destruir o parasito, sendo crítico para a sobrevivência do hospedeiro (BUZONI-GATEL et al., 2006).

Células T CD8<sup>+</sup> contribuem para controlar as infecções agudas devido à produção de IFN- $\gamma$  e ativação de macrófagos. Células infectadas são destruídas por células T CD8<sup>+</sup> liberando taquizoítas, que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos (anticorpos, macrófagos ativados e células NK). Desta forma, IFN- $\gamma$  representa o principal mediador de resistência através da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação de parasitos pela produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio que promovem a inativação de enzimas críticas para replicação do parasito. Assim, os dois componentes críticos da resposta imune contra *N. caninum* tanto em bovinos como em camundongos são as células T CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ , que influenciam o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, desenvolvem células efectoras citotóxicas e mantêm cistos teciduais contendo bradizoítas no animal imune (WILLIAMS; TREES, 2006).

Como controle destas atividades microbicidas e resposta pró-inflamatória que podem causar lesão intestinal, alguns linfócitos intra-epiteliais atuam produzindo TGF- $\beta$  que limita a produção de IFN- $\gamma$ , e outros atuam na destruição de enterócitos infectados (BUZONI-GATEL et al., 2006). Outra citocina que pode ser importante na regulação da resposta imune celular a *N. caninum* é IL-10, que tem efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , a diferenciação de clones Th1, a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a produção de IL-12 por células acessórias (INNES et al., 2002). Além disso, uma resposta do tipo Th1 pode afetar a gestação e levar ao aborto ou reabsorção fetal, enquanto uma resposta do tipo Th2 é protetora, com a produção de IL-4, IL-5 e IL-10 pelos tecidos fetais e placentários (QUINN et al., 2004).

As células B também são ativadas para secretar anticorpos, principalmente IgG2a em camundongos, que podem participar diretamente na neutralização e destruição de taquizoítas extracelulares e assim, controlar a disseminação da infecção (INNES et al., 2002). Em infecção experimental de cães pela inoculação oral de tecidos de bovinos infectados com *N. caninum*, os primeiros parecem não desenvolver respostas de anticorpo dentro das primeiras 3 a 4 semanas após infecção (GONDIM; GAO; McALLISTER, 2002). Entretanto, após 18 e 20 meses da infecção primária, a re-exposição induz nova eliminação de oocistos, indicando que a resposta imune humoral

por si não assegura que um cão seja refratário à produção de oocistos (GONDIM; McALLISTER; GAO, 2005).

#### **1.1.6 Sinais clínicos**

*N. caninum* causa aborto tanto em gado de corte como de leite, a partir do 3º mês até o final da gestação, sendo mais comum entre o 5º e 6º mês de gestação. Vários eventos podem ocorrer, como morte, reabsorção, mumificação ou autólise fetal dentro do útero, natimortos, recém-nascidos com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados (DUBEY, 2003).

Sinais clínicos são mais freqüentes em animais jovens (menor que 2 meses de idade) infectados congenitamente e predominantemente neurológicos, como ataxia, paralisia de membros posteriores (hiperextensão rígida), reflexos patelares diminuídos e perda de consciência. Em animais adultos, o aborto é o único sinal clínico observado, podendo ser esporádico, endêmico ou epidêmico (DUBEY, 2003).

A neosporose canina ocorre geralmente como infecção subclínica persistente que pode sofrer reativação durante a gestação, resultando em parasitemia materna e transmissão transplacentária endógena do parasito para o feto. Quando a infecção primária ocorre durante a gestação, pode haver transmissão transplacentária exógena e infecção do feto. Assim, ninhadas sucessivas podem estar infectadas (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002), embora em menor grau de transmissão vertical, sugerindo que a exposição pós-natal é necessária para manter o parasito na população canina (BARBER; TREES, 1998).

Neosporose canina clínica pode ser localizada ou generalizada, com o envolvimento de todos os órgãos, inclusive da pele causando a neosporose cutânea (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002). Uma característica nestes casos é o intenso parasitismo com um grande número de taquizoítas nas lesões cutâneas, sugerindo uma falta de controle imune do hospedeiro sobre a multiplicação dos parasitos. Os casos mais graves da doença localizada ocorrem em cães jovens com infecção congênita, que apresentam um quadro de paresia inicial de membros posteriores que progride para a paralisia. Sinais neurológicos são dependentes do local parasitado no Sistema Nervoso Central (SNC) e os membros posteriores são os mais afetados e ficam em hiperextensão rígida. Outras disfunções que podem ocorrer incluem dificuldade na deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular, paralisia de nervos faciais e até falência cardíaca (DUBEY, 2003).

### 1.1.7 Epidemiologia e prevalência

Neosporose bovina já foi relatada em muitas partes do mundo, incluindo Austrália, Nova Zelândia, Europa, Coreia, Japão e Américas (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Na América do Sul, aborto e mortalidade neonatal associados com neosporose foram descritos na Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai, mostrando que 12 a 42% de fetos abortados de bovinos de leite estavam infectados com *N. caninum*. A soroprevalência em bovinos varia dependendo do país, região, tipo de teste sorológico utilizado e nível de *cut off* para determinar a exposição ou infecção, chegando até a 87% de vacas soropositivas em algumas fazendas (MOORE, 2005). Na região do Triângulo Mineiro, a soroprevalência de neosporose em rebanhos bovinos com problemas reprodutivos foi estimada em 17% (MINEO et. al., 2006). Achados mais recentes confirmam a importância epidemiológica do parasito em rebanhos da Eslováquia (SPILOVSKÁ et. al., 2009), China (YU et. al., 2009) e Espanha (PANADERO et. al., 2009), revelando a distribuição de *N. caninum* nos diferentes continentes.

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

### 1.1.8 Controle

O controle da neosporose bovina é baseado na prevenção da contaminação do ambiente com oocistos de cães, restringindo o acesso destes animais nas proximidades do rebanho, sacrifício dos animais infectados ou usando sistema de transferência de embriões para prevenir transmissão do parasito a novas gerações (WILLIAMS; TREES, 2006). Porém, a vacinação parece ser um meio mais viável economicamente para controlar a neosporose, já que o sacrifício de animais ou seus possíveis tratamentos demandariam maiores despesas para os criadores dos rebanhos (REICHEL; ELLIS, 2009). Para neosporose canina, as recomendações têm sido direcionadas no sentido de evitar colocar em reprodução cadelas soropositivas para *N. caninum* bem como impedir

alimentação com carne ou vísceras cruas, principalmente os cães de áreas rurais, além de medidas de controle da população de cães dentro e ao redor das fazendas (McALLISTER; WALLACE, 1999).

Em relação à vacinação contra o parasito, até o presente momento, não há vacina capaz de induzir completa imunidade protetora em bovinos. Existe uma vacina disponível comercialmente (Bovilis NeoGuard®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, EUA), consistindo de taquizoítas inativados, mas com eficácia de apenas aproximadamente 50% (REICHEL; ELLIS, 2009).

A possibilidade de contaminantes com agentes patogênicos nos isolados de *N. caninum* implica que novas formulações de vacinas sejam investigadas. Antígenos de lisados totais com diferentes adjuvantes têm mostrado resultados contraditórios, variando desde 100% (LIDDELL et al., 1999) a parcial proteção (LUNDÉN et al., 2002) contra transmissão vertical em camundongos. Ramamoorthy e colaboradores (2006) demonstraram que taquizoítas de *N. caninum* tratados com radiação gama protegem camundongos contra a infecção, podendo ser utilizados como vacinas atenuadas e efetivas contra neosporose.

Desta forma, o desenvolvimento de formas alternativas de vacinas tem sido intensivamente pesquisado, na busca de novos antígenos protetores e modos de administração das vacinas. Neste contexto, vários antígenos imunodominantes de superfície de *N. caninum*, especialmente as proteínas NcSAG1 e NcSRS2 (seqüência 2 relacionada à SAG1) têm sido avaliados como candidatos potenciais de vacinas em modelos murinos, quer como proteínas nativas (HALDORSON et al., 2005) ou como proteínas recombinantes múltiplas (CANNAS et al., 2003; CHO et al., 2005).

Além disso, diferentes sistemas de administração de vacinas têm sido investigados, incluindo a utilização de vetores de vírus recombinante, como a imunização de cães com um vetor de herpesvírus canino expressando a proteína NcSRS2 (NISHIKAWA et al., 2000) ou a imunização de camundongos com o vírus de vaccínia recombinante carregando os genes das proteínas de superfície NcSAG1 ou NcSRS2 (NISHIKAWA et al., 2001a,b; OTSUKA; MIKAMI, 2001). Todas essas formulações têm demonstrado que a proteção é muitas vezes parcial e depende do tipo de antígeno e de adjuvante utilizados, assim como das estratégias de vacinação. Recentemente, Ribeiro e colaboradores (2009) utilizaram como adjuvante o oligodeoxinucleotídeo CpG, associado com antígeno de lisado total (NLA) e antígeno de excreção-secreção (NcESA) de *N. caninum*. Este estudo demonstrou que a vacinação

com o antígeno NLA associado com CpG resultou em total proteção dos camundongos após o desafio, enquanto o antígeno NcESA associado com o adjuvante induziu maior susceptibilidade dos animais à infecção. Dessa forma, mostra-se de grande importância a escolha do antígeno utilizado na imunização, assim como do adjuvante administrado, para que a resposta imunológica seja protetora sem causar danos ao organismo.

Assim, o desenvolvimento de formas alternativas de vacinas tem contribuído para a caracterização de novos antígenos protetores e estratégias inovadoras de administração das vacinas para a obtenção de procedimentos eficazes de vacinação.

## **1.2 Lectinas como adjuvantes e imunomoduladores**

Adjuvantes tem um importante papel na eficácia de vacinas, contribuindo tanto para aumentar a força e a cinética da resposta imune bem como direcionar o tipo de resposta. Além dos adjuvantes experimentais tradicionais como o adjuvante completo (ACF) ou incompleto (AIF) de Freund, a incorporação dos antígenos em partículas submicroscópicas compostas de saponina, colesterol e fosfolípidos, formando complexos imunoestimulantes (ISCOMS), tem mostrado aumentar a imunogenicidade, resultando em respostas imunes humoral e celular de longa duração. ISCOMS contendo antígenos nativos (LUNDÉN et al., 2002) ou proteínas recombinantes de NcSRS2 (PINITKIATISAKUL et al., 2005) demonstraram induzir imunidade protetora contra neosporose em camundongos.

O reconhecimento proteína-carboidrato é crucial para os processos celulares, assim como para interações entre células ou entre estas e a matriz extracelular para a diferenciação celular, adesão, migração, embriogênese, desenvolvimento e respostas imunológicas (VASTA, 2009). Lectinas são proteínas ligantes de carboidratos e glicoproteínas que podem ser encontradas em procariotos, corais marinhos, algas, fungos, animais vertebrados e invertebrados, e plantas (FRANÇOIS; BALZARINI 2010).

A maioria das lectinas é organizada como homo ou hetero oligômeros de subunidades polipeptídicas ligados não covalentemente, apresentando domínios que se ligam especificamente aos açúcares (CRDs), frequentemente um monossacarídeo ou oligossacarídeo não terminal. Muitas delas formam receptores de reconhecimento padrão (RRPs), incluindo as lectinas solúveis, como as colectinas (por exemplo, lectinas ligantes de manose e as surfactantes pulmonares), ficolinas e pentraxinas (por exemplo, as proteínas C-reativas) e lectinas integrais, como as lectinas do tipo C, incluindo

receptores de manose de macrófagos e receptores de células dendríticas (DC-SIGN) (VASTA, 2009).

Lectinas solúveis e associadas à membrana medeiam interações com microorganismos que podem levar a interações mutualísticas (comensalismo ou simbiose), colonização ou invasão do hospedeiro e reconhecimento imune. Embora as interações entre lectinas animais e seus ligantes são mais fracas comparadas com outras moléculas de reconhecimento como os anticorpos, uma avidéz alta pelo alvo é alcançada quando múltiplos CRDs interagem simultaneamente com o ligante, como observada nas colectinas e outras lectinas oligoméricas. Uma atenção maior é voltada para as lectinas tipo C, ficolinas, pentraxinas, lectinas do tipo F e galectinas, pois estas tem importantes funções imunológicas (VASTA, 2009).

As interações das lectinas com glicanas são ubíquas e essenciais para os sistemas biológicos, não somente para a adesão das células, mas como iniciadores de um “crosstalk” funcional que modula a fisiologia do organismo e seu balanço homeostático, tendo papéis na simbiose, colonização de patógenos e respostas imunológicas do hospedeiro (VASTA, 2009). Por exemplo, várias lectinas do tipo C, como as DC-SIGN nas células dendríticas, o receptor de manose dos macrófagos, e as lectinas solúveis ligantes de manose (MBL), ligam-se a oligossacarídeos na superfície de vírus e bactérias para removê-los do organismo, ou no caso de células apresentadoras de antígeno (APCs), apresentam os epítomos estranhos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, para evocar uma resposta imunológica mais eficiente contra o patógeno (FRANÇOIS; BALZARINI 2010).

O rendimento das lectinas animais, porém, é geralmente baixo comparado com o das lectinas vegetais que são investigadas em inúmeras funções, como em atividades antitumorais, imunomodulatórias, antifúngicas, inibitórias da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1, atividades agrotóxicas, antibacterianas e antinematóide.(LAM, 2011). Algumas lectinas apresentam ainda aplicações práticas como as lectinas Concanavalina A (ConA), aglutinina do germe do trigo (WGA) e a fitohemaglutinina (PHA) que são extensamente utilizadas em pesquisas científicas por conterem atividade mitogênica (FRANÇOIS; BALZARINI 2010).

A maioria das lectinas vegetais bem caracterizadas é isolada das famílias Leguminosae, Euphorbiaceae e Moraceae (KABIR, 1998). Lectinas de plantas têm sido utilizadas em vários estudos devido ao seu alto grau de especificidade por açúcares e

pelo seu potencial imunestimulador, induzindo a proliferação celular e a produção de perfis específicos de citocinas (PANUNTO-CASTELO, 2001; TOLEDO, 2009).

### **1.2.1 Lectinas KM<sup>+</sup> e Jacalina (*Artocarpus integrifolia*)**

A lectina KM<sup>+</sup>, também conhecida como Artocarpina e recentemente nomeada Artin M (PEREIRA-DA-SILVA; et al., 2008), é derivada da semente de *Artocarpus integrifolia* (Moraceae) e se liga especificamente a monossacarídeos  $\alpha$ -D-manose,  $\alpha$ -D-glucose, e  $\alpha$ -metil manoside, mas não demonstra afinidade por  $\alpha$ -D-galactose (ROSA; et al., 1999). A lectina KM<sup>+</sup> já é reconhecida por induzir macrófagos a produzirem IL-12 p40, estimulando a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos e induzir uma mudança do padrão de secreção de citocinas de Th2 para Th1 (PANUNTO-CASTELO; et al., 2001). Além disso, KM<sup>+</sup> é capaz de induzir uma potente ativação de neutrófilos, demonstrando sua capacidade de conferir resistência contra infecções (TOLEDO; et al., 2009). O papel de KM<sup>+</sup> como adjuvante foi analisado em modelos murinos com o antígeno de *Leishmania major* (SLA), resultando na proteção dos camundongos contra o desafio posterior (TEIXEIRA; et al., 2006).

A lectina Jacalina (JAC), a mais abundante proteína da semente de *A. integrifolia*, é caracterizada como uma lectina ligante de IgA e IgD, além de ter afinidade por D-galactose (ROQUE-BARREIRA; et al., 1985; KABIR, 1998). Ela induz células monocíticas da linhagem U937 a secretarem altos níveis de IL-6, a partir de sua ligação com a molécula CD4 da célula (TAIMI, 1994). Essa lectina também é descrita como uma poderosa molécula carreadora para a estimulação da produção de anticorpos anti-TNP (hapteno trinitrofenil) e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALBUQUERQUE; et al., 1999). Achados mais recentes demonstraram que Jacalina também induz a produção de IL-2 por células T em resposta à ligação do TCR e coestimulação do CD28, contribuindo para a produção tanto de citocinas do perfil Th1 como do perfil Th2 (BABA; et al., 2007). Além disso, a proteína foi capaz de induzir seletivamente respostas mitogênicas e bloquear a infecção pelo HIV do tipo 1 em linfócitos TCD4<sup>+</sup> (PINEAU, et al., 1990; CORBEAU, et al., 1994).

### **1.2.2 Lectina ScLL (*Synadenium carinatum*)**

*Synadenium carinatum* (Euphorbiaceae) é geralmente encontrada como planta ornamental popularmente conhecida como “leiteirinha ou folha santa” e a preparação

aquosa do seu látex tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas e câncer. A lectina do látex de *S. carinatum* (ScLL) foi isolada e purificada através de cromatografia de afinidade em D-galactose imobilizada em agarose, exibindo potente atividade hemaglutinante para diferentes grupos sanguíneos humano e animal (SOUZA et al., 2005).

O potencial imunestimulador da ScLL bem como o seu efeito adjuvante em um modelo de vacinação contra leishmaniose cutânea experimental foram investigados (AFONSO-CARDOSO et al., 2007), mostrando que ScLL associada ou não ao antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* na imunização de camundongos induziu uma potente resposta do tipo Th1 caracterizada pela secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$  bem como redução da taxa de infecção após o desafio com *L. amazonensis*. Porém, achados mais recentes sugerem que a administração oral dessa lectina inibe o extravasamento de neutrófilos e eosinófilos na inflamação crônica e aguda de modelos murinos de asma, além de reduzir níveis de IL-4, IL-5, aumentando os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, sugerindo possuir um papel imunorregulador (ROGÉRIO, et al., 2007).





*Justificativa*

## 2. JUSTIFICATIVA

*Neospora caninum* causa grande impacto econômico tanto na indústria agropecuária devido às perdas de animais, queda na produção de leite e ganho de peso, bem como às perdas afetivas quando se trata principalmente de cães. Embora seja desejável estudar a imunidade a *N. caninum* em espécies de hospedeiros naturais, os custos envolvidos e dificuldades na disponibilidade de animais e reagentes específicos para análise da resposta imune tornam-se fatores limitantes. Assim, diferentes linhagens de camundongos isogênicos são rotineiramente utilizadas como modelos experimentais para o estudo da infecção por *N. caninum*, tanto na infecção cerebral para comparar produção de cistos teciduais em cérebros, carga parasitária, lesões e respostas de citocinas bem como na infecção congênita e transmissão vertical do parasito. Devido à prevalência e importância econômica da neosporose, o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra *N. caninum* para prevenir abortos e transmissão vertical em bovinos e cães, bem como para controlar a disseminação de oocistos pelo hospedeiro definitivo, é prioridade em pesquisas científicas e é crucial para limitar a infecção pelo parasito nestes hospedeiros naturais.

Vários tipos de vacinas contra *N. caninum* utilizando parasitos vivos, irradiados, antígenos de lisados de células totais ou proteínas recombinantes, assim como vacinas com vírus vaccínia recombinante têm sido avaliadas, mostrando que a proteção conferida é, na maioria das vezes, parcial e dependente dos adjuvantes utilizados. Lectinas de plantas também têm sido investigadas como adjuvantes em modelos de infecção como leishmaniose, mas até o presente momento, não há relatos na literatura sobre o uso de lectinas associadas a antígenos de *N. caninum* com propósitos de vacinação contra neosporose em modelos murinos ou em hospedeiros naturais.

Assim, foram avaliados o efeito adjuvante e o potencial imunoestimulador das lectinas KM<sup>†</sup> e Jacalina da semente de *Artocarpus integrifolia* e da lectina ScLL do látex de *Synadenium carinatum* na imunização de camundongos contra a infecção por *N. caninum*.

*Objetivos*



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Avaliar o efeito adjuvante e potencial imunoestimulador das lectinas de *Artocarpus integrifolia* (KM<sup>+</sup> e Jacalina) e *Synadenium carinatum* (ScLL) na imunização de camundongos contra a infecção por *N. caninum*.

#### 3.2 Específicos

- Analisar a resposta imune humoral dos camundongos imunizados com antígeno de lisado total de *N. caninum* associado ou não com as lectinas, por meio de mensuração dos anticorpos séricos IgG e isotipos IgG1 e IgG2a contra *N. caninum*;
- Analisar a resposta imune celular dos camundongos imunizados com antígeno de lisado total de *N. caninum* associado ou não com as lectinas, por meio da análise de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-10) produzidas por células do baço após estimulação mitogênica e antigênica *in vitro*;
- Avaliar o efeito protetor da imunização de camundongos com antígeno de lisado total de *N. caninum* associado ou não com as lectinas, contra o desafio letal de *N. caninum* por meio da determinação dos escores de morbidade, porcentagem de sobreviventes, alterações histopatológicas e carga parasitária cerebral.



*Material e métodos*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção de parasitos

Os parasitos do isolado Nc-1 (DUBEY et al., 1988b) de *N. caninum* foram mantidos em cultura celular, usando linhagens de células VERO como descrito anteriormente (RIBEIRO et al., 2009) e utilizados para a preparação de antígenos e no desafio de camundongos. Células VERO foram cultivadas em frascos de cultura celular em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C até atingirem a confluência.

As células foram infectadas com taquizoítas de *N. caninum* que foram mantidos por passagens seriadas em meio RPMI com 2% de SFB, a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados por descamação da monocamada celular (*cell scraper*) e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 13 x 4 mm e centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (700 x g, 10 minutos, 4°C) com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2). O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuscitado em PBS e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).

Os parasitos foram armazenados a -20°C até a preparação do antígeno solúvel de *N. caninum* ou foram imediatamente utilizados para o desafio dos animais ou tratados com formol para preparação de lâminas para imunofluorescência indireta.

### 4.2 Preparação do antígeno solúvel de lisado total de *N. caninum*

O antígeno solúvel de lisado total de *N. caninum* (NLA) foi preparado como descrito anteriormente (RIBEIRO et al., 2009), com algumas modificações. Suspensões parasitárias (1x10<sup>8</sup> taquizoítas/mL) foram descongeladas, tratadas com inibidores de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto [PMSF] a 1,6 mM, leupeptina a 50 µg/mL e aprotinina a 10 µg/mL) e submetidas a 10 ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de 0,22 µm (filtros

Millex, Millipore, EUA), a concentração protéica foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA, Sigma Chemical Co.).

Alíquotas de NLA foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até serem utilizadas na imunização de camundongos, estimulação *in vitro* de células do baço e como antígeno em reações imunoenzimáticas (ELISA) na análise da resposta de anticorpos de camundongos imunizados.

#### **4.3 Preparação dos taquizoítas para reação de imunofluorescência indireta**

Taquizoítas de *N. caninum* foram preparados para a reação de imunofluorescência indireta como previamente descrito (CAMARGO, 1964). Suspensões parasitárias foram ajustadas para concentração de  $1 \times 10^6$  taquizoítas/mL e tratadas com formaldeído a 1% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após centrifugação rápida (45 x g, 1 minuto,  $4^{\circ}\text{C}$ ) para remover parasitos aglomerados, o sobrenadante foi lavado com PBS por duas vezes (700 x g, 10 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ). O sedimento final foi ressuspenso em água destilada estéril até obter concentração de 20-30 parasitos por campo microscópico (aumento de 400X).

Um volume de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão parasitária foi adicionado em áreas demarcadas de lâminas microscópicas para imunofluorescência (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro Ltda., São Paulo, SP, Brasil) que foram mantidas à temperatura ambiente por 3 a 4 horas para completa fixação dos parasitos. As lâminas com taquizoítas formolizados de *N. caninum* foram individualmente embaladas em lenços de papel e, posteriormente, em papel alumínio e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas em reações de imunofluorescência indireta.

#### **4.4 Lectinas de *Artocarpus integrifolia* (KM<sup>+</sup> e Jacalina) e *Synadenium carinatum* (ScLL)**

As lectinas de *Artocarpus integrifolia* (KM<sup>+</sup> e Jacalina) foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Cristina Roque-Barreira do Laboratório de Glicobiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. A preparação do extrato total de sementes de *Artocarpus integrifolia* e a obtenção das lectinas ligantes de manose (KM<sup>+</sup>) e D-galactose (Jacalina) foram realizadas como

anteriormente descrito (ROQUE-BARREIRA et al., 1986; BUNN-MORENO; CAMPOS-NETO, 1981).

A lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL) foi obtida a partir do extrato aquoso do látex da planta como descrito por Souza e colaboradores (2005), com algumas modificações. O látex extraído da planta foi homogeneizado com água destilada (1:10) a 4°C por 48 horas, centrifugado (3.500 x g, 30 minutos, 4°C) e filtrado em membrana clarificante (0,45 µm; Merck, Göttingen, Alemanha), originando o extrato aquoso total. Este extrato total foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de D-galactose imobilizada em agarose (Pierce, Rockford, IL, EUA) e a fração ligante foi eluída com D-galactose (Sigma Chemical Co.) a 0,4 M em solução salina tamponada com borato (BBS) a 0,05 M (pH 8,0) e, em seguida, concentrada e dialisada contra BBS. A concentração protéica foi determinada pelo método de BCA (Sigma Chemical Co.) e a sua atividade hemaglutinante foi confirmada por ensaios de hemaglutinação, segundo protocolo descrito anteriormente (SOUZA et al., 2005). Alíquotas das lectinas foram armazenadas a -20°C até a utilização nos protocolos de imunização dos animais.

#### **4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A homogeneidade e pureza das lectinas (KM<sup>+</sup>, Jacalina e ScLL) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (ScLL) ou 15% (KM<sup>+</sup> e Jacalina), em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições não-redutoras (KM<sup>+</sup> e Jacalina) ou redutoras (ScLL), utilizando 2-mercaptoetanol a 10% (LAEMMLI, 1970).

Amostras de lectinas foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e incubadas por 5 minutos a 100 °C para análise por SDS-PAGE, utilizando sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hofer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). Um volume de 15 µL de cada amostra (aproximadamente 20 µg de proteína total) foi aplicado em paralelo aos padrões de peso molecular (Sigma Marker, Sigma Chemical Co.; BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a separação eletroforética, o gel foi corado por *Coomassie blue* ou *Coomassie blue* coloidal (G250; Sigma Chemical Co.).



#### 4.5 Animais e imunização

Um total de 144 camundongos isogênicos C57BL6, fêmeas, com 8 a 12 semanas de idade foram obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclos de 12 h de luz e 12 h de escuro, com água e ração *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO A).

Para os procedimentos experimentais, os animais foram distribuídos a princípio, em três grandes grupos de acordo com a lectina utilizada como adjuvante para a imunização (KM<sup>+</sup>, Jacalina e ScLL). Esses grupos foram divididos em quatro subgrupos, com 12 animais em cada grupo, conforme a seguinte formulação:

<b>Grupo</b> <b>Subgrupo</b>	<b>KM<sup>+</sup></b>	<b>Jacalina</b>	<b>ScLL</b>
<b>1</b>	NLA(25µg)+KM <sup>+</sup> (1µg)	NLA(25µg)+Jac(100µg)	NLA(25µg)+ScLL(50µg)
<b>2</b>	NLA(25µg)	NLA(25µg)	NLA(25µg)
<b>3</b>	KM <sup>+</sup> (1µg)	JAC(100µg)	ScLL(50µg)
<b>4</b>	PBS estéril	PBS estéril	PBS estéril

Os animais foram aleatoriamente distribuídos, identificados e imunizados por via subcutânea (s.c) com três doses das formulações descritas acima, em um volume de 200 µL por animal, em intervalos de 15 dias. As concentrações dos antígenos e lectinas foram determinadas com base em estudos anteriores (ROQUE-BARREIRA et al., 1986; SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994; ALBUQUERQUE et al., 1999; AFONSO-CARDOSO et al., 2007).

Os animais foram submetidos à sangria prévia (dia 0) e amostras de sangue foram coletadas aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após a primeira imunização. Os soros obtidos após centrifugação (720 x g, 5 minutos) foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizados em testes sorológicos para análise de anticorpos.

## 4.6 Avaliação da resposta imune humoral

### 4.6.1 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para IgG e subclasses anti-*N. caninum*

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

Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com amostras de soros (50 µL/poço) diluídas 1:25 em PBS-TM a 5% para IgG total e PBS-TM a 1% para IgG1 e IgG2a, por 1 hora (IgG) ou 2 horas (IgG1 e IgG2a) a 37°C. Soros controles positivos de camundongos experimentalmente infectados com *N. caninum* e soros controles negativos (soros de camundongos não imunes) também foram incluídos. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas (50 µL/poço) com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição 1:1000 em PBS-TM a 5% ou com os anticorpos secundários biotinizados (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA) anti-IgG1 de camundongo diluído 1:4000 em PBS-TM a 1% ou anti-IgG2a de camundongo diluído 1:2000 em PBS-TM a 1%. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas e incubadas (50 µL/poço) com estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluída 1:1000 em PBS-TM a 1%, quando apropriado (para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a).

A reação foi revelada com 0,01 M 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS) e 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Chemical Co.), e a densidade óptica foi determinada a 405 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA).

#### 4.6.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para IgG anti-*N. caninum*

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada para verificar o padrão de marcação dos taquizoítas de *N. caninum* com amostras de soros de camundongos dos diferentes grupos aos 45 dias após imunização, segundo o protocolo anteriormente descrito (SILVA et al., 2007).

Lâminas contendo taquizoítas formolizados de *N. caninum* foram incubadas com amostras de soros (10 µL/poço) diluídos 1:50 em PBS contendo 0,1% de soroalbumina bovina (BSA; Sigma Chemical Co.). Após incubação durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas três vezes durante cinco minutos com PBS e incubadas (10 µL/poço) com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma Chemical Co.) na diluição 1:50 em PBS contendo azul de Evans a 0.01%. Após incubação por 30 minutos a 37°C, as lâminas foram novamente lavadas, montadas com lamínulas e glicerina tamponada (pH 9,5) e examinadas em microscópio epifluorescente (EVOS, FSX100<sup>TM</sup> Bio Imaging Navigator, Olympus, Center Valley, PA).

#### 4.6.3. Immunoblot

O antígeno NLA (200 µg de proteína total) foi diluído em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e incubado por 5 minutos a 100°C para análise por SDS-PAGE a 12% sob condições não-redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). Um volume de 150 µL da amostra de NLA foi aplicado em paralelo ao padrão de peso molecular (BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a separação eletroforética, o gel foi corado por *Coomassie blue* ou eletrotransferido para membranas de nitrocelulose para *immunoblot*.

*Immunoblot* foi realizado para verificar o perfil de reatividade dos soros de camundongos aos 45 dias após imunização com o antígeno NLA associado ou não com as lectinas, segundo o protocolo anteriormente descrito (RIBEIRO et al., 2009). Após a separação eletroforética como descrito acima, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Millipore, Bedford, EUA), utilizando sistema semi-úmido de transferência (MultiPhor Novablot II, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia)

por 2 horas (TOWBIN; STAEHELIN, GORDON, 1979). O sucesso da transferência foi confirmado por visualização das frações do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose por meio de coloração com solução de Ponceau a 0,5%. A membrana foi cortada em tiras de 3 mm de largura e bloqueadas com PBS-T contendo leite desnatado (PBS-TM) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente, as tiras foram incubadas com amostras de soros de camundongos diluídas 1:50 em PBS-TM a 1% por 18 horas a 4°C sob agitação lenta. Após seis ciclos de lavagens durante cinco minutos com PBS-T, as tiras foram incubadas com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído 1:1000 em PBS-TM a 1% por 2 horas à temperatura ambiente.

Após novo ciclo de lavagens, as tiras foram reveladas pela adição do substrato enzimático que consistiu de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e 10 mg/mL de 3,3'- tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical Co.) em salina tamponada com 0,02 M Tris-HCl (pH 7,4). As massas moleculares aparentes das bandas antigênicas foram estimadas a partir dos cálculos da mobilidade relativa (Rf), segundo a curva do padrão de peso molecular de referência.

#### **4.7 Avaliação da resposta imune celular: análise de citocinas**

Após 45 dias de imunização (15 dias após a 3ª dose), três animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e os baços removidos assepticamente para cultura celular e estimulação de células *in vitro*. Os baços foram individualmente macerados em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e 2-mercaptoetanol (50 µM). Suspensões celulares foram lavadas (350 x g, 5 minutos, 4°C) em meio RPMI e o sedimento de células foi ressuscitado com 2 mL de tampão de lise (0.16 M NH<sub>4</sub>Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) para eritrócitos, incubando-se por 5 minutos a 37°C. Após lavagens por mais duas vezes em meio RPMI, o sedimento final foi ressuscitado com 5 mL de meio RPMI suplementado contendo 10% SFB e a suspensão celular foi mantida em banho de gelo até a contagem de células viáveis em câmara hemocitométrica, usando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% em PBS. As suspensões celulares foram cultivadas, em quadruplicata, em placas de cultura de 96 poços (2 x 10<sup>5</sup> células/poço/200 µL) e estimuladas com o mitógeno concanavalina A (ConA: Sigma Chemical Co.) a 2,5 µg/mL ou antígeno de lisado total de *N. caninum*

(NLA) a 10 µg/mL. Como controle, células não estimuladas foram adicionadas de meio de cultura somente. As células foram incubadas por 48 horas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Os sobrenadantes de cultura celular foram coletados e armazenados a -70°C para posterior análise de citocinas.

A dosagem das citocinas IFN-γ e IL-10 foi realizada pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelo fabricante (IFN-γ, R&D Systems, Minneapolis, EUA; IL-10, BD Biosciences, San Diego, EUA). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente. Após lavagem das placas com PBS-T e bloqueio com soluções bloqueadoras específicas para cada análise, os sobrenadantes de cultura foram adicionados. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados por 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]).

A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de detecção obtido para cada análise foi 31 pg/mL e os coeficientes de variação intra-análise foram abaixo de 15%.

#### **4.8 Desafio**

Após 30 dias da última imunização (60 dias da imunização inicial), os animais de todos os grupos foram inoculados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum*, em um volume de 200 µL, por via intraperitoneal. Os animais foram observados diariamente quanto à morbidade, mortalidade e alterações de peso corporal durante 30 dias após o desafio. A avaliação da morbidade foi estabelecida utilizando um sistema baseado em escores como previamente descrito (BARTLEY et al., 2006), com algumas modificações, de acordo com os seguintes critérios: (0) pêlo normal, animal

ativo; (1) pêlo ouriçado; (2) pêlo muito arrepiado, animal apático, (3) animal relutante a se mover, (4) animal apático, com o pêlo muito arrepiado.

Após 30 dias do desafio, os animais sobreviventes foram sacrificados e os cérebros coletados e divididos longitudinalmente em duas partes, uma das quais foi armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para avaliar a quantidade de DNA do parasito por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. A outra metade do tecido cerebral foi fixada em formalina a 10% tamponada com fosfatos 10 mM (pH 7,2) para análises histopatológica e imunohistoquímica.

#### 4.9 PCR em tempo real

DNA de *N. caninum* no cérebro de camundongos desafiados foi quantificado por PCR em tempo real, através do sistema de detecção SYBR *green*, como anteriormente descrito (RIBEIRO et al., 2009). Foram utilizados os seguintes pares de *primers*: *Forward*: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; *Reverse*: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3' (Prodimol Biotecnologia S.A., Belo Horizonte, MG), para detecção da região Nc5 de *N. caninum*. A extração de DNA foi realizada a partir de 20 mg de tecido cerebral utilizando o kit de purificação de DNA genômico (Wizard®, Promega Co., Madison, EUA), segundo protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm) e ajustada para 200 ng/ $\mu\text{L}$  com água estéril e livre de DNase.

Os ensaios para quantificar a carga parasitária cerebral foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (7500 Real time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a contagem de parasitas foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraídos de  $10^6$  taquizoítas do isolado Nc-1 que foram incluídas em cada análise. Os resultados foram expressos em picogramas de DNA/200 ng de tecido cerebral.

#### 4.10 Análises histopatológica e imunohistoquímica

Amostras de tecido cerebral fixadas em 10% de formalina por 24 horas foram incluídas em parafina e processadas para análise histológica de rotina. Cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram depositados em lâminas microscópicas e corados por hematoxilina-eosina para análise histológica, avaliando-se a infiltração de leucócitos no SNC, por meio de escores inflamatórios como previamente descrito (SILVA et al., 2010). Para

obter o escore do infiltrado inflamatório no SNC, o número total de focos inflamatórios locais ou difusos foi quantificado em seções sagitais e na bainha dos vasos sanguíneos (manguito perivascular). A infiltração de células inflamatórias nas meninges foi também analisada. Os escores inflamatórios foram representados como unidades arbitrárias como sendo: 0 – 1, suave; 1– 2, moderado; 2,1– 3, grave; e acima de 3, muito grave. As alterações histológicas no SNC foram avaliadas em duas seções cerebrais não contíguas (40 µm de distancia entre elas) de cada animal, em pelo menos quatro animais por grupo, utilizando objetiva de 40 x de aumento, em ensaio duplo cego.

Alternativamente, os cortes foram processados para a reação de imunohistoquímica para quantificar o parasitismo tecidual, segundo protocolos anteriormente descritos (SILVA et al., 2002a; RIBEIRO et al., 2009), com algumas modificações. Os cortes foram desparafinizados em xilol, rehidratados em concentrações decrescentes de álcool e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos com peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Após a realização do resgate de sítios antigênicos com tampão citrato 0.2 M (pH 6,0) por 5 min em microondas, os sítios não-específicos foram bloqueados com soro normal de cabra a 2% em PBS e, logo em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário (soro de camundongo experimentalmente infectado com *N. caninum*) diluído 1:100 em PBS contendo BSA 1% por 18 horas a 4°C. Após duas lavagens de 5 minutos em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo marcada com biotina (Sigma Chemical Co.) diluído 1:200 em PBS por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, a reação foi amplificada pela incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase biotilada (Vectastain® ABC system, Vector Laboratories, Peterborough, Inglaterra) diluído 1:250 em PBS durante 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com o substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e DAB (Sigma Chemical Co.) e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas e examinadas em microscopia óptica (FSX100<sup>TM</sup> Bio Imaging Navigator, Olympus, Center Valley, PA).

#### **4.11 Análise estatística**

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes

em cada ponto após o desafio e as curvas de sobrevivência foram comparadas usando os testes *log rank* e  $\chi^2$ . Diferenças entre os grupos na análise de anticorpos, dosagem de citocinas, escores de morbidade, alterações de peso corporal e carga parasitária cerebral foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando apropriado, utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn, respectivamente, para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. O teste *t* de Student foi utilizado para comparação entre isotipos IgG1 e IgG2a dentro de cada grupo. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

#### **4.12 Normas de biossegurança e manipulação de animais**

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005). Os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996).



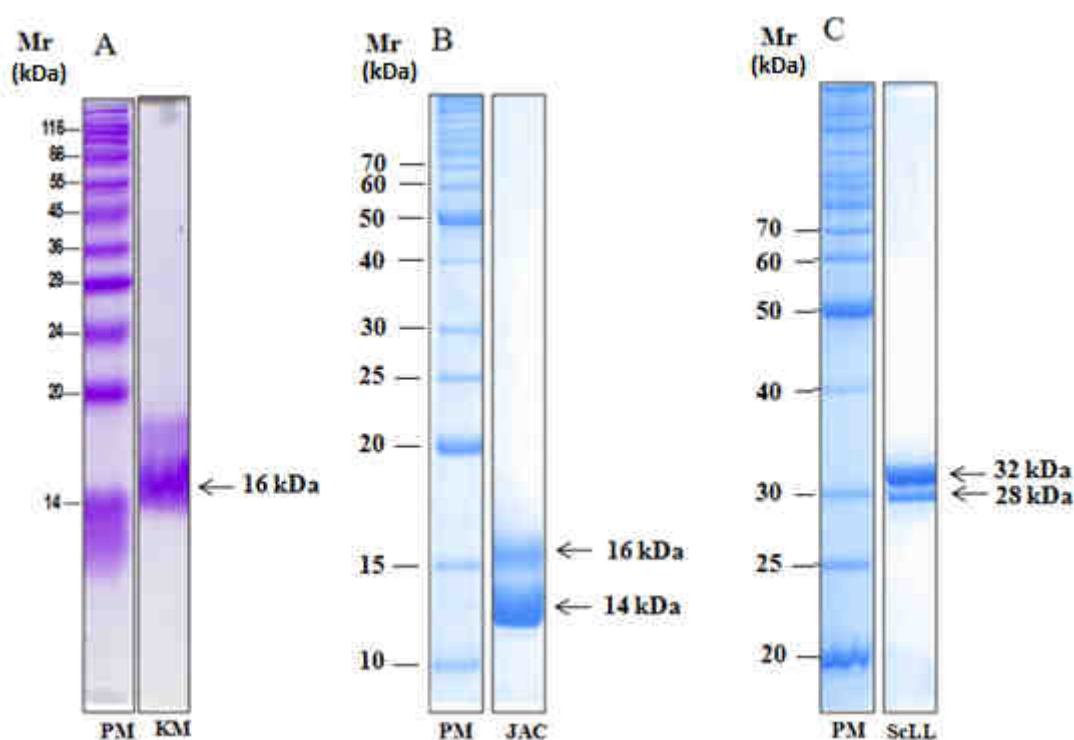


*Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Homogeneidade e pureza das lectinas $KM^+$ , Jacalina e ScLL

A homogeneidade e pureza das lectinas estão demonstradas na Figura 1. A lectina  $KM^+$  está representada na figura 1A, apresentando uma banda fortemente corada com massa molecular aparente de 16 kDa. As lectinas Jacalina (Figura 1B) e ScLL (Figura 1C) apresentam duas bandas de tamanho e coloração distintos, com massas moleculares aparentes de 14-16 kDa para Jacalina, e 28-32 kDa para ScLL.



**Figura 1.** Perfil eletroforético das lectinas  $KM^+$  (A) e Jacalina (JAC) (B) de *Artocarpus integrifolia* e ScLL (C) de *Synadenium carinatum* em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15% ( $KM^+$  e JAC) e 12% (ScLL), corado com *Coomassie blue* (A) ou *Coomassie blue* coloidal (B e C). PM: marcadores de peso molecular: (A) Sigma Marker (Sigma Chemical Co.); (B e C) BenchMark<sup>TM</sup> (Invitrogen) expressos em kiloDaltons (kDa).

## 5.2 Resposta imune humoral após imunização e desafio com *N. caninum*

A cinética da resposta imune humoral de anticorpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos imunizados com o antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup>, Jacalina (JAC) e ScLL, e respectivos grupos controles (lectinas somente e PBS) está demonstrada nas figuras 2, 3 e 4.

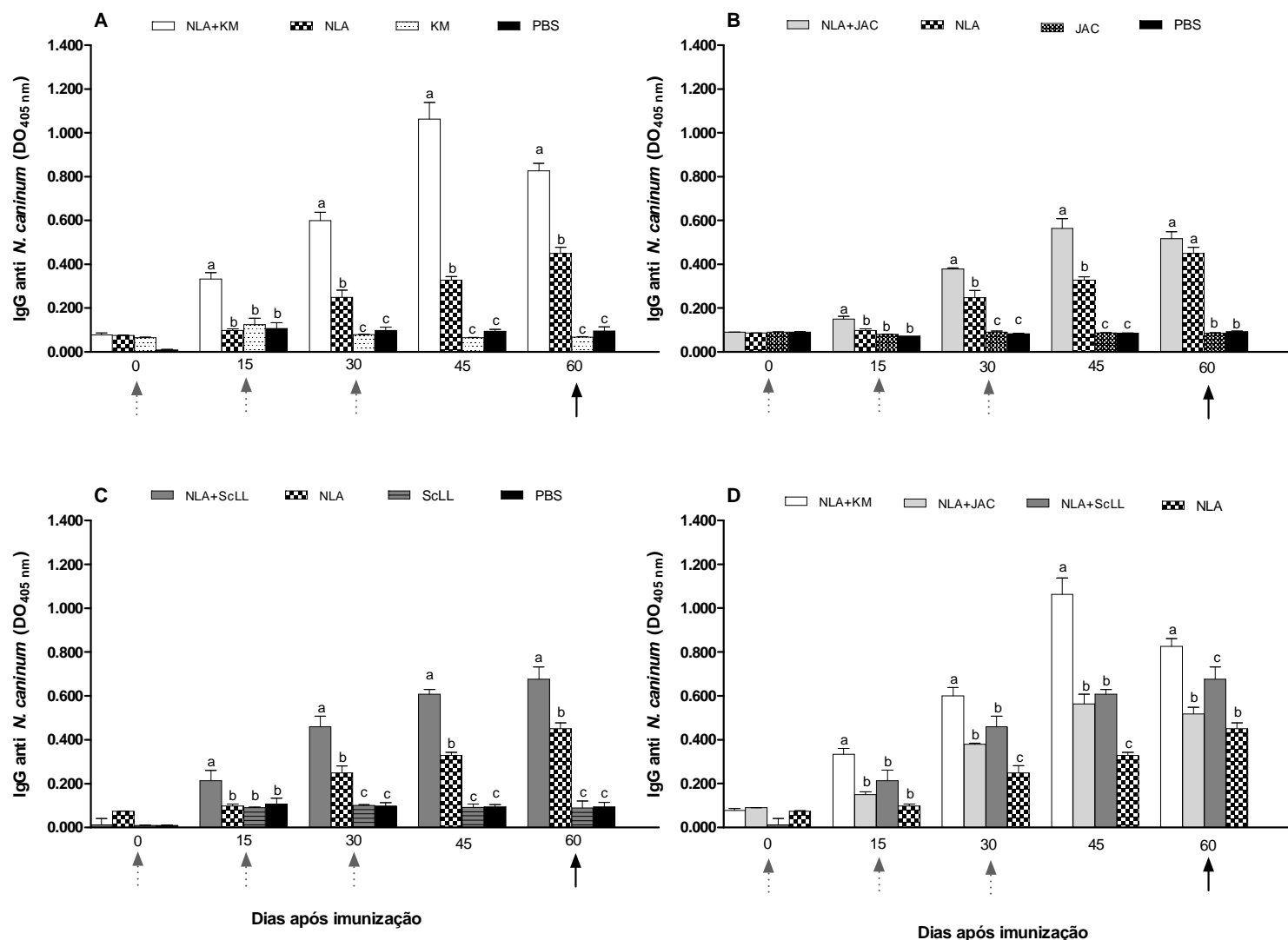
Camundongos imunizados com NLA+KM apresentaram níveis significativamente maiores de IgG total anti-*N. caninum* do 15° ao 60° dia pós-imunização (d.p.i.) em comparação com os animais imunizados apenas com NLA e controles (KM e PBS) (Figura 2A). Um perfil cinético similar foi observado para os animais imunizados com NLA+ScLL em relação aos grupos NLA, ScLL e PBS (Figura 2C). Para o grupo JAC (Figura 2B), foi observada resposta imune humoral mais branda, porém com maior produção de IgG total do 15° ao 45° d.p.i. nos animais imunizados com NLA+JAC em relação aos grupos NLA, JAC e PBS ( $p < 0,05$ ). No 60° d.p.i., os animais imunizados apenas com NLA produziram níveis semelhantes de IgG total em relação ao grupo NLA+JAC (Figura 2B). Na comparação dos níveis de anticorpos entre os três grupos de lectinas associadas com NLA (Figura 2D), observou-se maior produção de IgG total do 15° ao 60° d.p.i. no grupo NLA+KM em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

Na análise da cinética do isotipo IgG1 anti-*N. caninum* (Figura 3), o grupo NLA+KM demonstrou maiores níveis de IgG1 do 15° ao 45° d.p.i. em comparação com o grupo NLA ( $p < 0,05$ ), com níveis semelhantes entre estes grupos somente no 60° d.p.i. (Figura 3A). Os animais imunizados com NLA+JAC não apresentaram nenhuma diferença significativa nos níveis de IgG1 do 15° até o 30° d.p.i. quando comparado aos animais do grupo NLA (Figura 3B). A partir do 45° d.p.i., o grupo imunizado apenas com NLA mostrou maior produção de IgG1 em comparação com NLA+JAC e com os grupos controles, JAC e PBS ( $p < 0,05$ ). Para o grupo ScLL (Figura 3C), a cinética de anticorpos foi semelhante a do grupo KM, com maiores níveis de IgG1 produzidos pelo grupo NLA+ScLL do 15° ao 45° d.p.i. ( $p < 0,05$ ) e, a partir do 60° d.p.i., sem diferença significativa com o grupo NLA. Comparando os três grupos imunizados com NLA associado às lectinas (Figura 3D), foi possível observar maior produção de IgG1 do 15° ao 30° d.p.i. no grupo NLA+ScLL em comparação com os demais ( $p < 0,05$ ). No 45° d.p.i., os níveis de IgG1 foram similares nos grupos NLA+ScLL e NLA+KM, porém maiores em relação aos demais ( $p < 0,05$ ). No 60° d.p.i., maiores níveis de IgG1 foram

detectados nos grupos NLA+ScLL e NLA em comparação com os outros grupos ( $p < 0,05$ ).

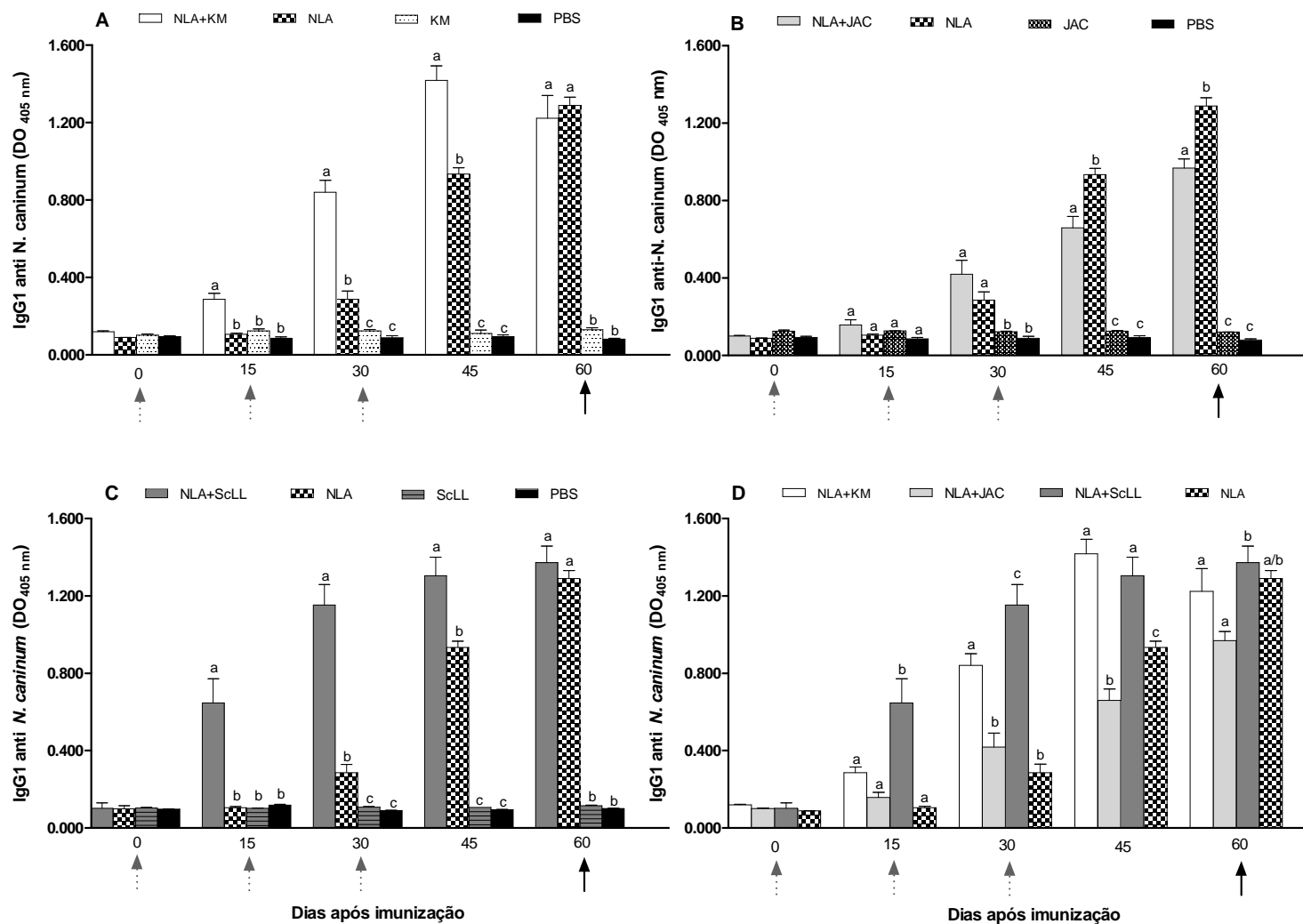
A cinética do isotipo IgG2a anti-*N. caninum* (Figura 4) apresentou um padrão distinto daquela observada para o isotipo IgG1. Camundongos imunizados com NLA+KM apresentaram maiores níveis de IgG2a em relação aos demais grupos do 15° ao 45° d.p.i. ( $p < 0,05$ ), assemelhando ao grupo NLA no 60° d.p.i. (Figura 4A). Para os grupos JAC (Figura 4B) e ScLL (Figura 4C), os animais imunizados com NLA ou associado com as lectinas apresentaram níveis similares de IgG2a até o 45° d.p.i.. No 60° d.p.i. o grupo NLA produziu maiores níveis de IgG2a comparado com os demais ( $p < 0,05$ ) (Figuras 4B e 4C). Na comparação dos níveis de anticorpos produzidos pelos três grupos de lectinas, foi observado que os níveis de IgG2a produzidos pelo grupo NLA+KM foram maiores do que os demais grupos do 15° ao 45° d.p.i. (Figura 4D). No 60° d.p.i., entretanto, níveis de IgG2a foram similares entre todos os grupos, embora os grupos NLA+JAC e NLA+ScLL apresentaram níveis de IgG2a inferiores ao grupo NLA ( $p < 0,05$ ).

## IgG total



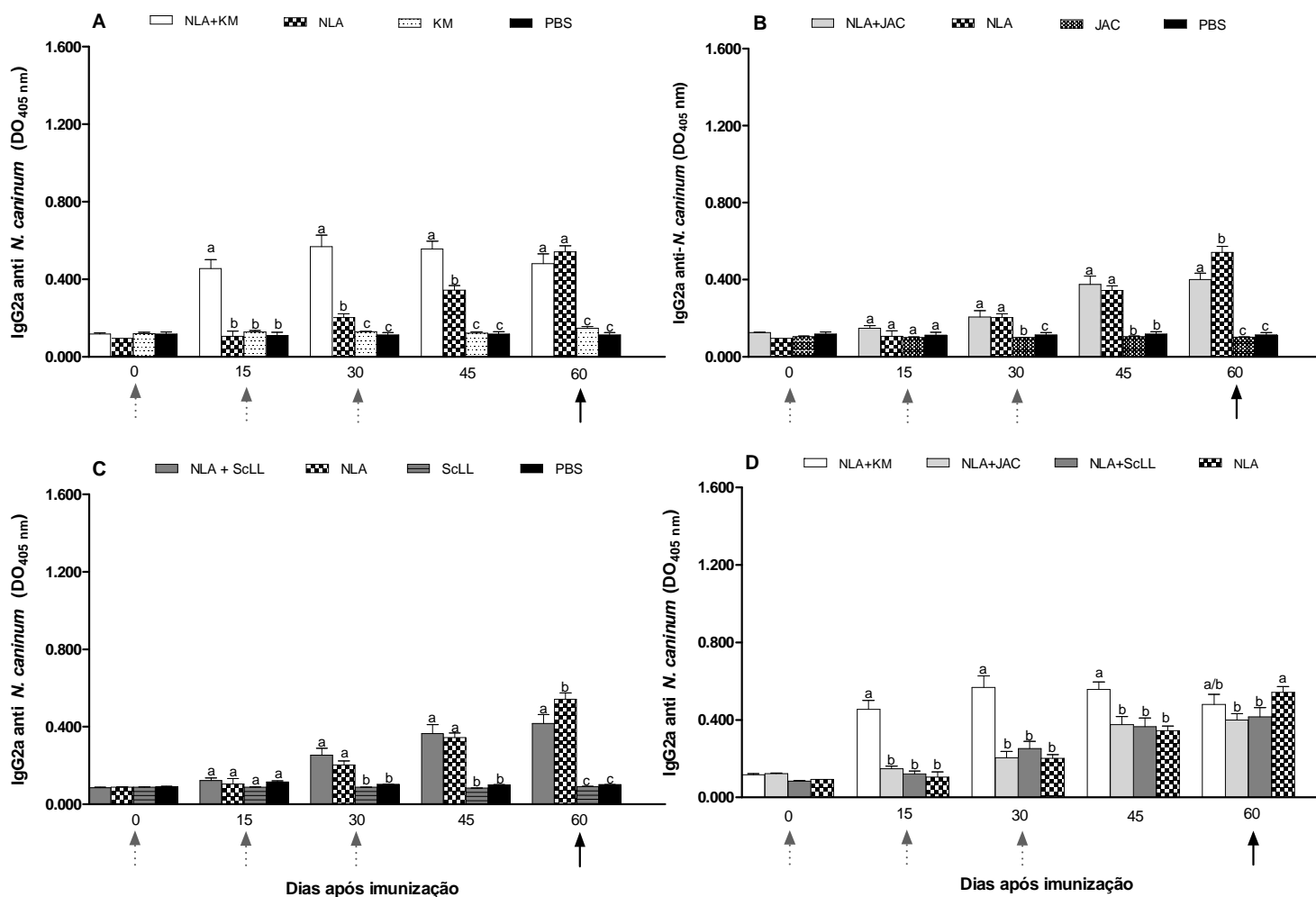
**Figura 2.** Níveis de IgG total anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes (setas cinzas pontilhadas) com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os grupos de animais imunizados com NLA+KM, NLA+JAC, NLA+ScLL e NLA é também demonstrada (D). Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 (seta preta contínua). Amostras de sangue foram coletadas aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias após imunização. Valores de densidade óptica (DO<sub>405nm</sub>) são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. <sup>a,b,c</sup>Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).

## IgG1



**Figura 3.** Níveis de IgG1 anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes (setas cinzas pontilhadas) com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os grupos de animais imunizados com NLA+KM, NLA+JAC, NLA+ScLL e NLA é também demonstrada (D). Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 (seta preta contínua). Amostras de sangue foram coletadas aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias após imunização. Valores de densidade óptica (DO<sub>405nm</sub>) são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. <sup>a,b,c</sup>Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).

## IgG2a

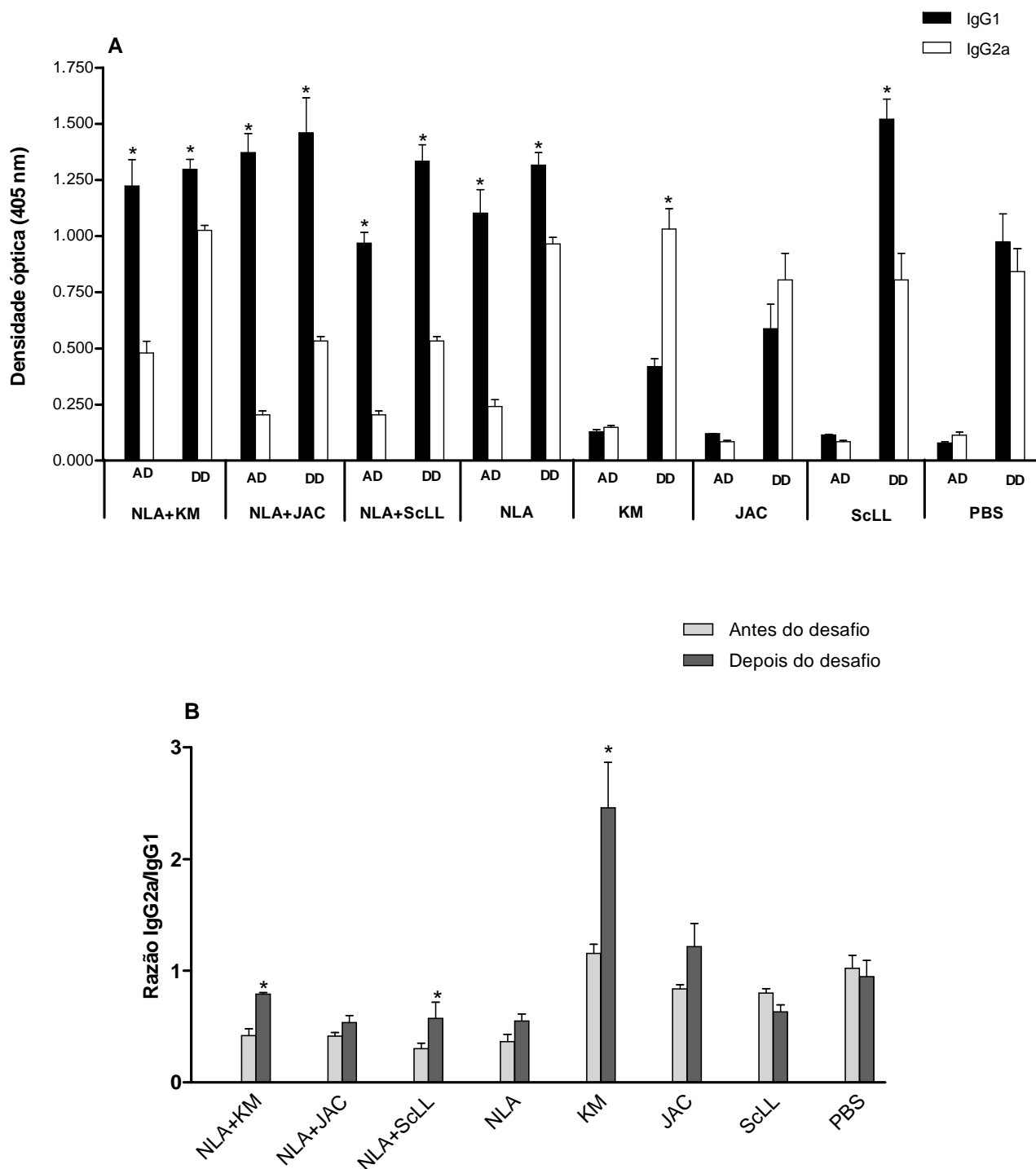


**Figura 4.** Níveis de IgG2a anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes (setas cinzas pontilhadas) com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os grupos de animais imunizados com NLA+KM, NLA+JAC, NLA+ScLL e NLA é também demonstrada (D). Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 (seta preta contínua). Amostras de sangue foram coletadas aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias após imunização. Valores de densidade óptica (DO<sub>405nm</sub>) são indicados como média  $\pm$  erro padrão da média. <sup>a,b,c</sup>Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).

A soroconversão e a resposta de isotipos de IgG anti-*N. caninum* foram comparadas antes, com 60 d.p.i., e após o desafio letal com taquizoítas do isolado Nc-1 em todos os grupos experimentais (Figura 5). Antes do desafio, os níveis de IgG1 anti-*N. caninum* foram significativamente mais elevados do que IgG2a em todos os grupos experimentais imunizados com o antígeno associado ou não com as lectinas ( $p < 0,05$ ). Após o desafio, o padrão de resposta se manteve predominantemente para o isotipo IgG1 nestes grupos (Figura 5A). Foi também observada a soroconversão de todos os animais dos grupos controles (KM, JAC, ScLL e PBS) após o desafio com taquizoítas Nc-1. Porém, notadamente, o grupo imunizado apenas com a lectina KM<sup>+</sup> mostrou soroconversão predominante para IgG2a, enquanto o grupo imunizado apenas com a lectina ScLL apresentou resposta predominante para IgG1 ( $p < 0,05$ ). Os grupos imunizados somente com JAC ou PBS apresentaram soroconversão similar entre ambos isotipos (Figura 5A).

Para verificar se houve alteração no perfil de resposta dos isotipos IgG1 e IgG2a após o desafio, foi calculada a razão IgG2a/IgG1 antes e após o desafio para todos os grupos experimentais (Figura 5B). Foi observado maior aumento da razão IgG2a/IgG1 após o desafio somente nos grupos NLA+KM, NLA+ScLL e, notadamente, no grupo KM em relação aos demais ( $p < 0,05$ ).

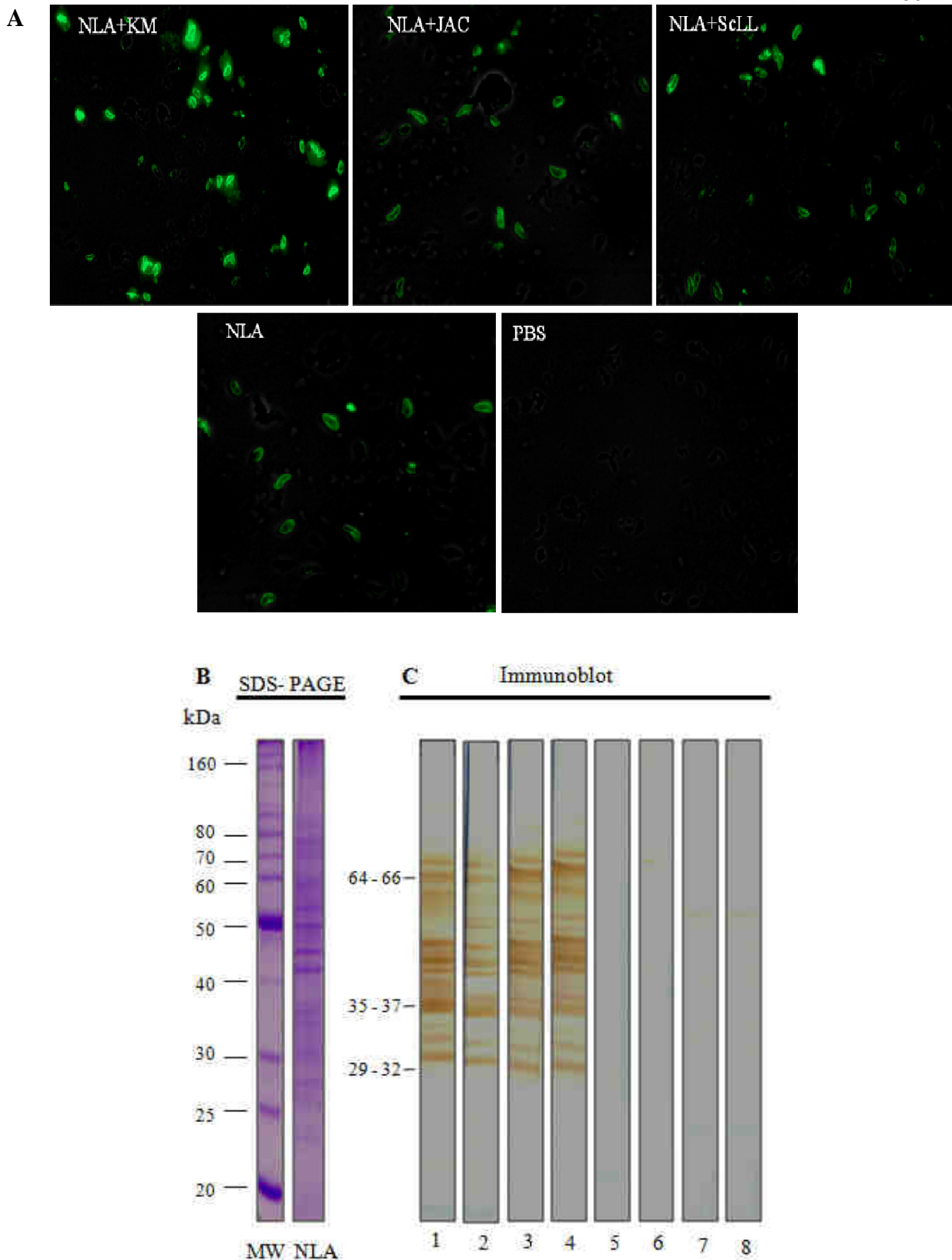




**Figura 5.** (A) Soroconversão e resposta de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup>, JAC e ScLL. As amostras de soros foram analisadas aos 60 dias após imunização antes do desafio (AD) e aos 30 dias depois do desafio (DD). A razão IgG2a/IgG1 antes e depois do desafio em cada grupo é também demonstrada (B). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  (teste *t* de Student).

O padrão de imunomarcção dos taquizoítas de *N. caninum* e o perfil de reatividade dos soros de camundongos imunizados estão representados na Figura 6. O padrão de imunomarcção foi analisado com amostras de soros de camundongos aos 45 d.p.i. em todos os grupos experimentais por imunofluorescência indireta. Soros de animais imunizados com NLA+KM apresentaram um padrão distinto de imunomarcção quando comparados com os demais grupos, apresentando fluorescência mais brilhante na superfície dos taquizoítas (Figura 6A). Animais imunizados com NLA+JAC mostraram uma marcação intermediária enquanto animais imunizados com NLA+ScLL e NLA apresentaram um padrão semelhante de imunomarcção, com fluorescência brilhante e linear na superfície dos taquizoítas, comparado à ausência de marcação no grupo controle PBS (Figura 6A).

O perfil de reatividade dos soros dos animais imunizados aos 45 d.p.i. em todos os grupos experimentais foi analisado por *immunoblot*. O gel de SDS-PAGE corado por *Coomassie blue* mostrou o perfil eletroforético do antígeno NLA, com uma ampla faixa de componentes protéicos (20 a 160 kDa) (Figura 6B). Resultados de *immunoblot* mostraram um padrão de reatividade similar de anticorpos IgG exibido por soros de camundongos imunizados com NLA+KM, NLA+JAC, NLA+ScLL e NLA, porém com marcação diferenciada de alguns antígenos entre os grupos. Os soros dos grupos imunizados apenas com as lectinas KM, JAC, ScLL e o grupo PBS não apresentaram qualquer reatividade de anticorpos (Figura 6C).



**Figura 6.** (A) Fotomicrografia de taquizoítas de *N. caninum* com soros de camundongos C57BL/6 após 45 dias de imunização com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup>, JAC e ScLL em reação de imunofluorescência indireta. Aumento de 400 X. (B) Perfil eletroforético do antígeno NLA de *N. caninum* em SDS-PAGE a 12% corado por Comassie Blue e (C) *Immunoblot* do antígeno NLA testado com soros representativos de cada grupo experimental: NLA+KM (linha 1); NLA+JAC (linha 2); NLA+ScLL (linha 3); NLA (linha 4); KM (linha 5); JAC (linha 6). ScLL (linha 7) e PBS (linha 8). Marcadores de pesos moleculares (MW) e antígenos imunodominantes de *N. caninum* são expressos em kiloDaltons (kDa).

### 5.3 Resposta imune celular: produção de citocinas

A resposta imune celular foi analisada a partir da produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em sobrenadantes de cultura de células do baço após estimulação mitogênica e antigênica (Figuras 7, 8 e 9).

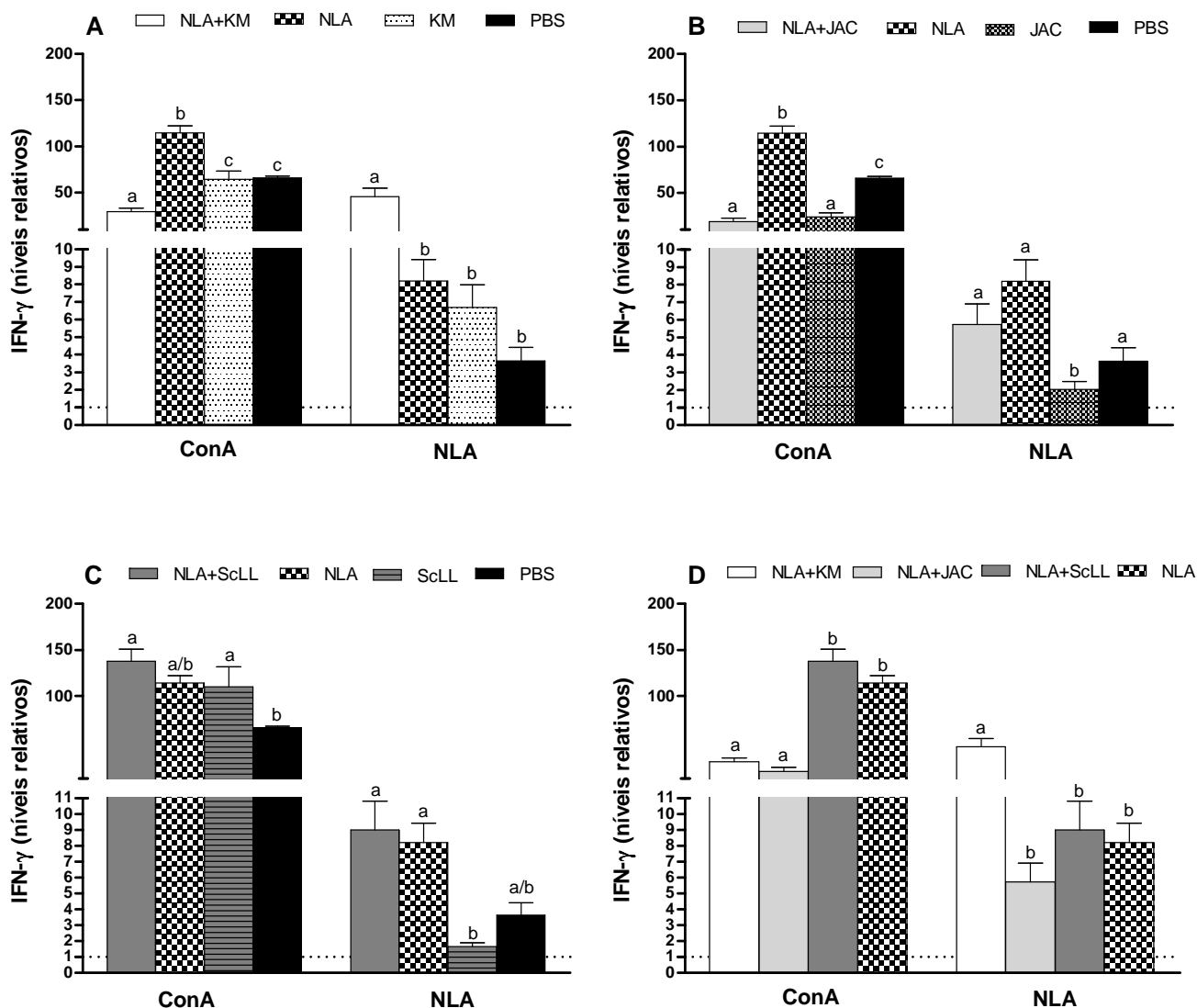
A resposta das células do baço estimuladas com o mitógeno ConA foi evidenciada pelos altos níveis de produção de IFN- $\gamma$  em todos os grupos quando comparado com o meio, notadamente para os grupos NLA+ScLL, ScLL e NLA (Figura 7).

Após estimulação antigênica, células dos camundongos imunizados com NLA+KM secretaram maiores níveis de IFN- $\gamma$  em relação aos grupos NLA, KM e PBS ( $p < 0,05$ ), sendo que estes não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 7A). O grupo imunizado com NLA+JAC não apresentou diferença significativa nos níveis de IFN- $\gamma$  quando comparado com os grupos NLA e PBS. Somente o grupo JAC mostrou menores níveis de IFN- $\gamma$  em relação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 7B). A produção de IFN- $\gamma$  foi significativamente menor nos animais imunizados somente com a lectina ScLL quando comparado com os grupos NLA+ScLL e NLA ( $p < 0,05$ ) (Figura 7C). Na comparação entre os animais imunizados com NLA associado ou não com as três lectinas (Figura 7D), foi possível observar que apenas o grupo NLA+KM produziu significativamente maiores quantidades de IFN- $\gamma$  em relação aos demais ( $p < 0,05$ ).

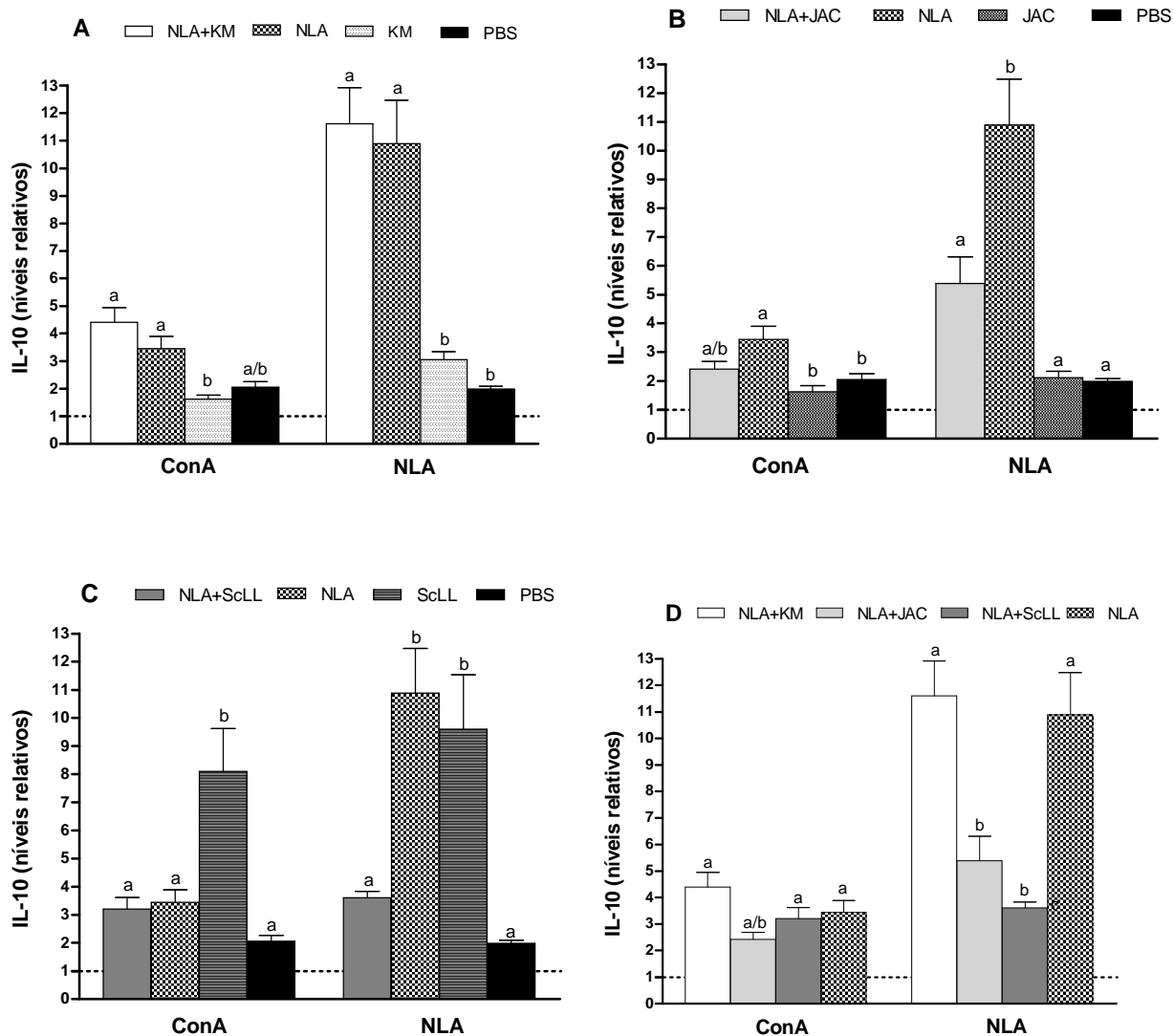
Na análise de IL-10, a estimulação mitogênica induziu níveis moderados de IL-10 em todos os grupos, em relação ao meio, e mais evidente para o grupo ScLL (Figura 8). Após estimulação antigênica, o grupo NLA+KM apresentou altos níveis desta citocina, porém sem diferença significativa em relação ao grupo NLA, mas ambos os grupos apresentaram maiores níveis de IL-10 comparados aos grupos KM e PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 8A). Para o grupo da lectina Jacalina, apenas o grupo NLA mostrou maiores níveis de IL-10 em relação aos demais (NLA+JAC, JAC e PBS) ( $p < 0,05$ ) (Figura 8B). Por outro lado, o grupo NLA+ScLL apresentou baixos níveis de IL-10 quando comparado com os grupos NLA e ScLL isoladamente ( $p < 0,05$ ), assemelhando-se ao grupo PBS (Figura 8C). Comparando-se os três grupos de lectinas, foi observado que os grupos NLA+KM e NLA apresentaram o mais alto nível de IL-10, seguido pelos grupos NLA+JAC e NLA+ScLL ( $p < 0,05$ ) (Figura 8D).

A razão IFN- $\gamma$ /IL-10 também foi analisada em cada grupo (Figura 9). O grupo NLA+KM (Figura 9A) apresentou a maior razão quando comparado com os demais ( $p$

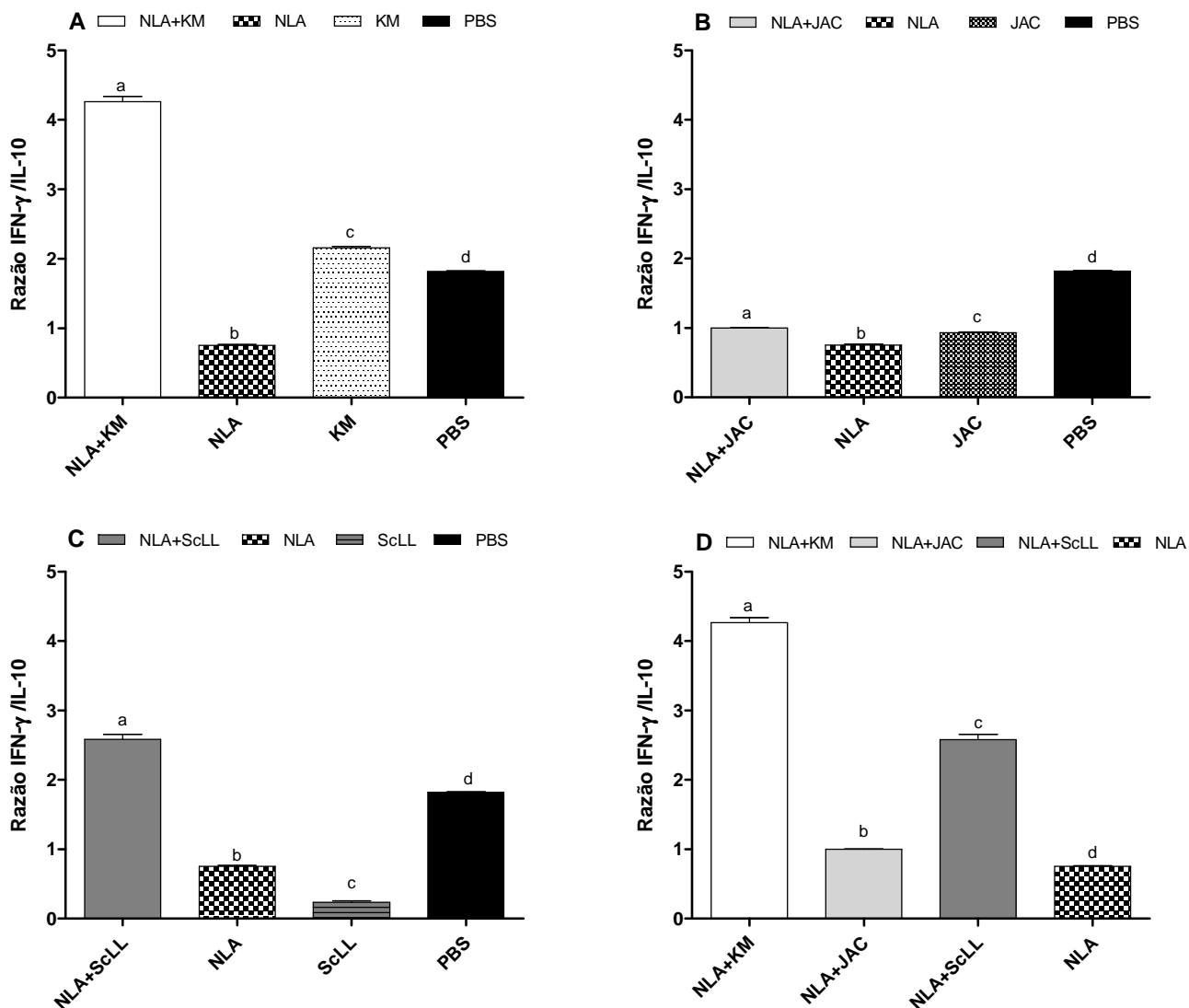
< 0,05), seguido pelos grupos KM e PBS, enquanto a menor razão foi observada para o grupo NLA ( $p < 0,05$ ). Os animais imunizados com NLA+JAC, NLA e JAC (Figura 9B) apresentaram razão IFN- $\gamma$ /IL-10 menor do que o grupo PBS ( $p < 0,05$ ), sendo a menor razão também observada para o grupo NLA ( $p < 0,05$ ). O grupo NLA+ScLL obteve a maior razão em relação aos grupos NLA, ScLL e PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 9C), com a menor razão sendo observada para o grupo ScLL ( $p < 0,05$ ). Na comparação entre os três grupos de lectinas, o grupo NLA+KM mostrou a mais alta razão IFN- $\gamma$ /IL-10, seguida pelo grupo NLA+ScLL ( $p < 0,05$ ) e NLA+JAC ( $p < 0,05$ ) (Figura 9D).



**Figura 7.** Produção de IFN- $\gamma$  por células de baço de camundongos C57BL6 imunizados subcutaneamente três vezes com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os três grupos de lectinas também é demonstrada (D). As células foram coletadas duas semanas após a 3<sup>a</sup> dose de imunização e cultivadas na presença do mitógeno Concanavalina A (ConA, 2,5  $\mu$ g/mL), antígeno NLA (10  $\mu$ g/mL), ou meio somente. Sobrenadantes de cultura foram analisados após 48 horas por ELISA. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos níveis relativos ao meio e a linha pontilhada indica o valor basal (meio). <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).



**Figura 8.** Produção de IL-10 por células de baço de camundongos C57BL/6 imunizados subcutaneamente três vezes com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os três grupos de lectinas também é demonstrada (D). As células foram coletadas duas semanas após a 3<sup>a</sup> dose de imunização e cultivadas na presença do mitógeno Concanavalina A (ConA, 2,5 µg/mL), antígeno NLA (10 µg/mL), ou meio somente. Sobrenadantes de cultura foram analisados após 48 horas por ELISA. Dados são expressos como média ± erro padrão da média dos níveis relativos ao meio e a linha pontilhada indica o valor basal (meio). <sup>a,b,c</sup>Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).



**Figura 9.** Razão IFN- $\gamma$ /IL-10 da produção de citocinas por células de baço de camundongos C57BL6 imunizados subcutaneamente três vezes com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os três grupos de lectinas também é demonstrada (D). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  (ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).



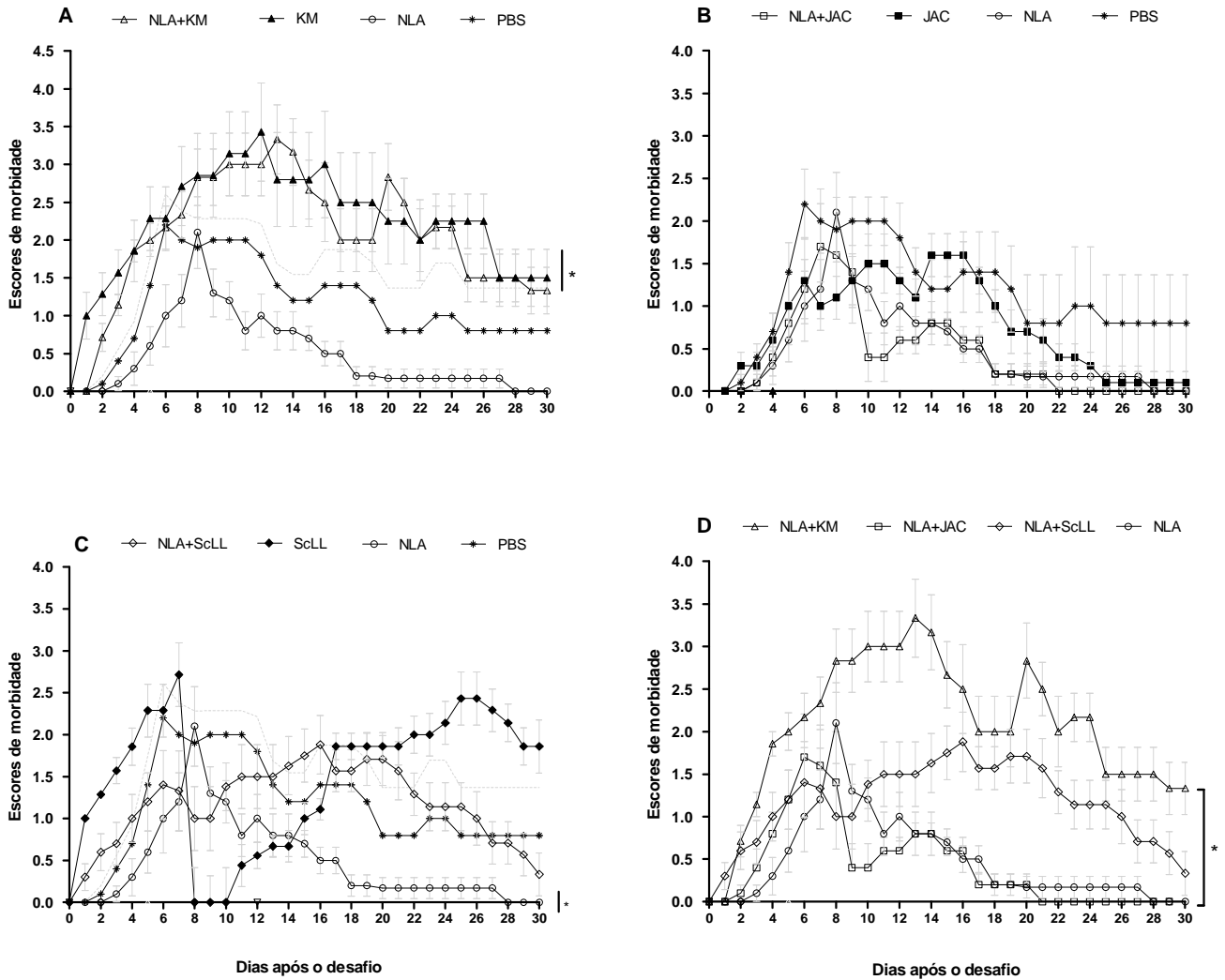
#### 5.4 Morbidade e mortalidade após desafio com *N. caninum*

Após desafio letal com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1, os camundongos foram observados diariamente e avaliados por escores de morbidade (Figura 10) e alterações do peso corporal (Figura 11).

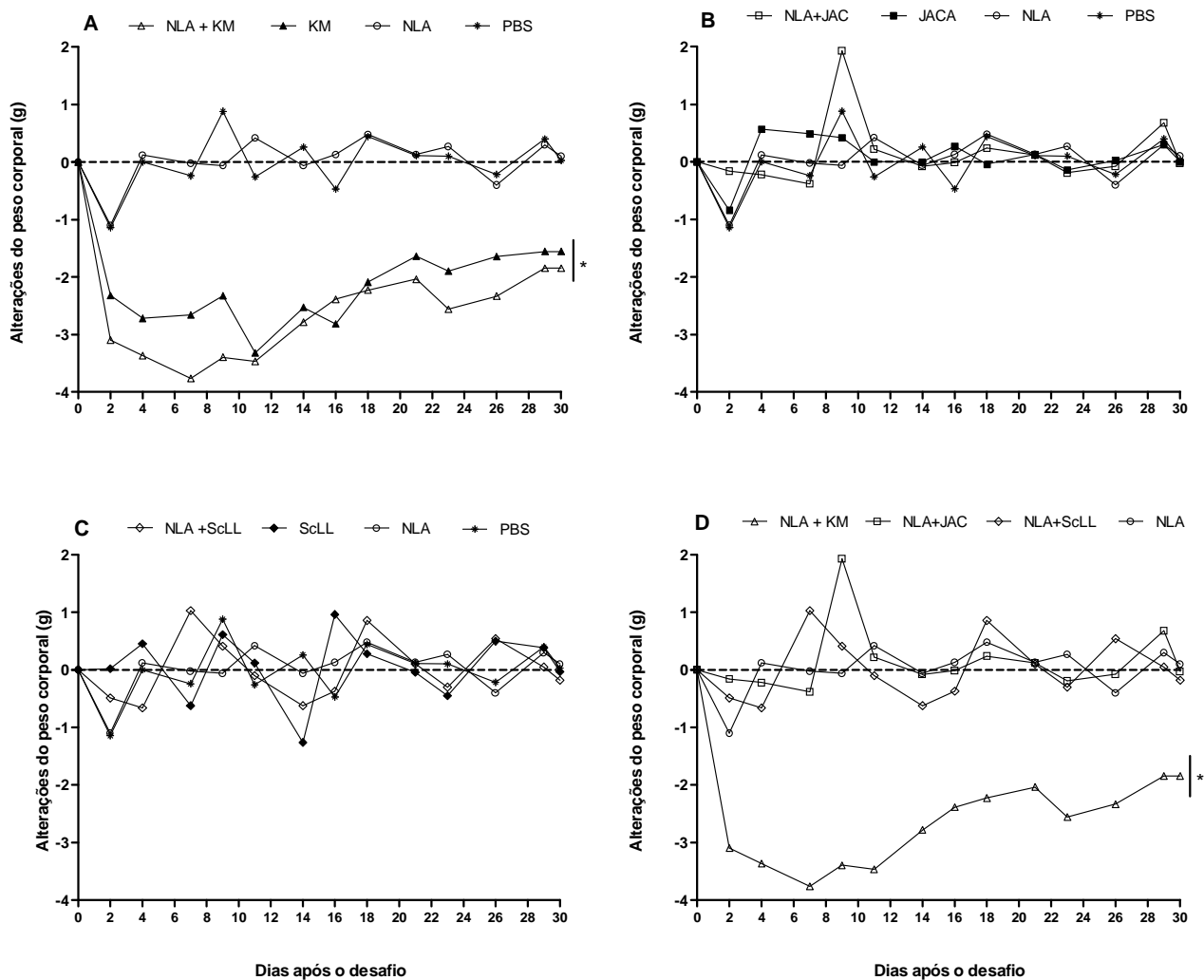
Observou-se que os camundongos imunizados com NLA+KM e KM apresentaram a maior média dos escores de morbidade em comparação com os animais que foram imunizados apenas com NLA ou PBS ( $p < 0,05$ ), mostrando sinais clínicos a partir do 2º dia até o final do período de observação (30 dias) e escores máximos aos 10-12 dias após o desafio (Figura 10A). O grupo imunizado com NLA+JAC não apresentou diferenças significativas na média dos escores de morbidade em relação aos respectivos grupos controles, embora todos os grupos apresentassem sinais clínicos a partir do 4º dia e escores máximos aos 6-8 dias após o desafio (Figura 10B). Na análise do grupo da lectina ScLL, a média dos escores de morbidade foi significativamente menor apenas para os camundongos que receberam imunização com NLA em relação aos respectivos controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 10C). Entretanto, todos os grupos mostraram sinais clínicos a partir do 2º dia e escores máximos aos 6-8 dias após o desafio. Não houve diferença significativa dos escores de morbidade entre os três grupos de lectinas associadas ao NLA, diferindo apenas entre os grupos NLA+KM e NLA (Figura 10D).

A análise das alterações do peso corporal dos animais em relação ao tempo zero do desafio está ilustrada na Figura 11. Os animais imunizados com NLA+KM e KM perderam maior quantidade de massa corporal em relação aos grupos NLA e PBS, notadamente de 2 a 10 dias após o desafio ( $p < 0,05$ ) (Figura 11A). Para os grupos das lectinas JAC (Figura 11B) e ScLL (Figura 11C), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Na comparação entre os três grupos de lectinas associadas ao NLA, foram observadas diferenças significativas somente no grupo imunizado com NLA+KM, mostrando significativa perda de peso em relação aos demais ( $p < 0,05$ ) (Figura 11D).

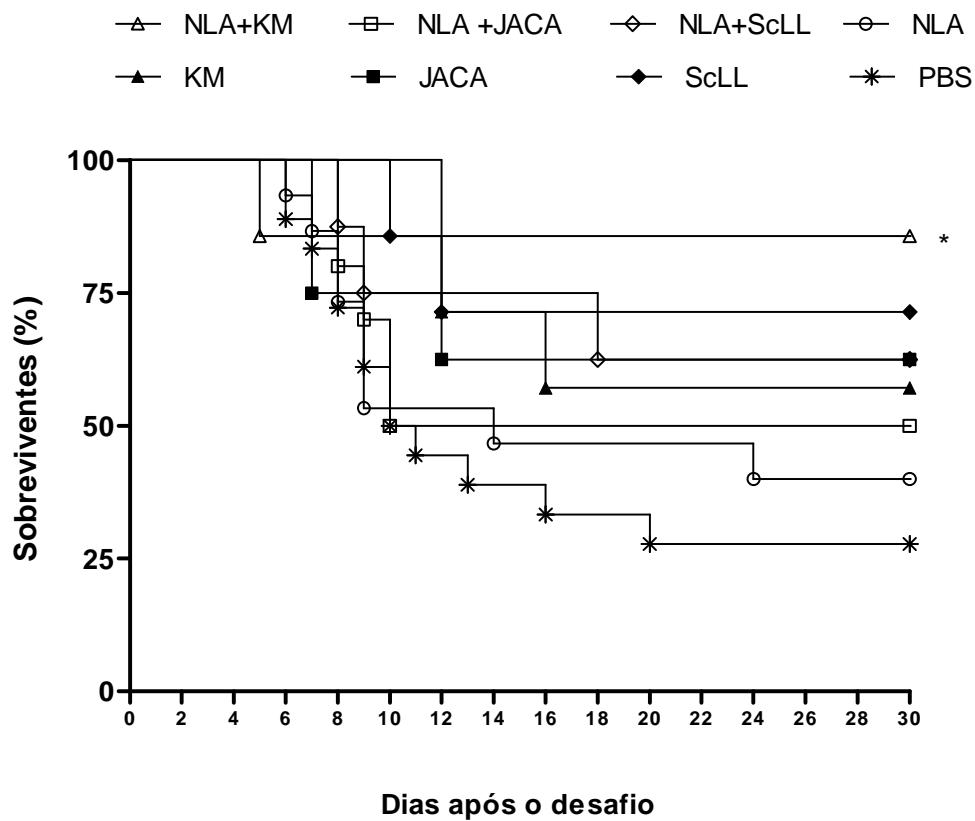
Observou-se diariamente a mortalidade dos camundongos após o desafio e foram determinadas as curvas de sobrevivência (Figura 12). Foi observada maior sobrevivência dos animais imunizados com NLA+KM (87%), com diferença significativa em relação ao grupo PBS (40%) ( $p < 0,05$ ). Os demais grupos apresentaram sobrevivência intermediária, entre 50% e 70%, porém sem apresentar diferenças significativas entre si e em relação ao grupo controle PBS.



**Figura 10.** Escores de morbidade de camundongos C57BL6 imunizados com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizófitas do isolado Nc-1. A comparação entre os três grupos de lectinas também é demonstrada (D). Dados são expressos em média e erro padrão da média. \*Diferença significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).



**Figura 11.** Alterações de peso corporal (em média) de camundongos C57BL6 imunizados com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1. A comparação entre os três grupos de lectinas também é demonstrada (D). \*Diferença significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).



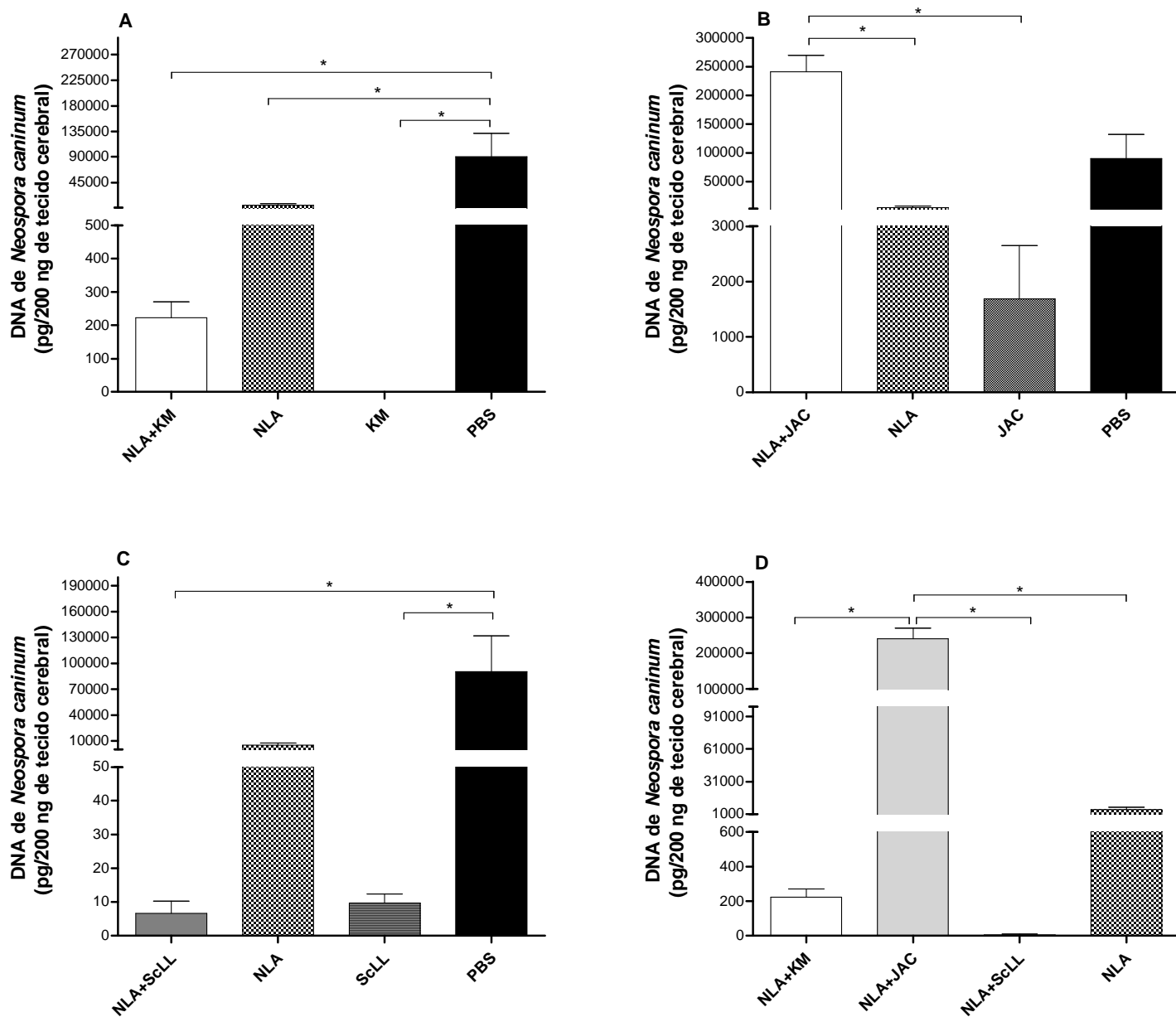
**Figura 12.** Curva de sobrevivência de camundongos C57BL6 imunizados com antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. Camundongos foram desafiados com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1. A comparação entre os três grupos de lectinas também é demonstrada (D). \*Diferença significativa em relação ao grupo PBS ( $p < 0,05$ ; testes *log rank* e  $\chi^2$ ).

### 5.5. Carga parasitária cerebral

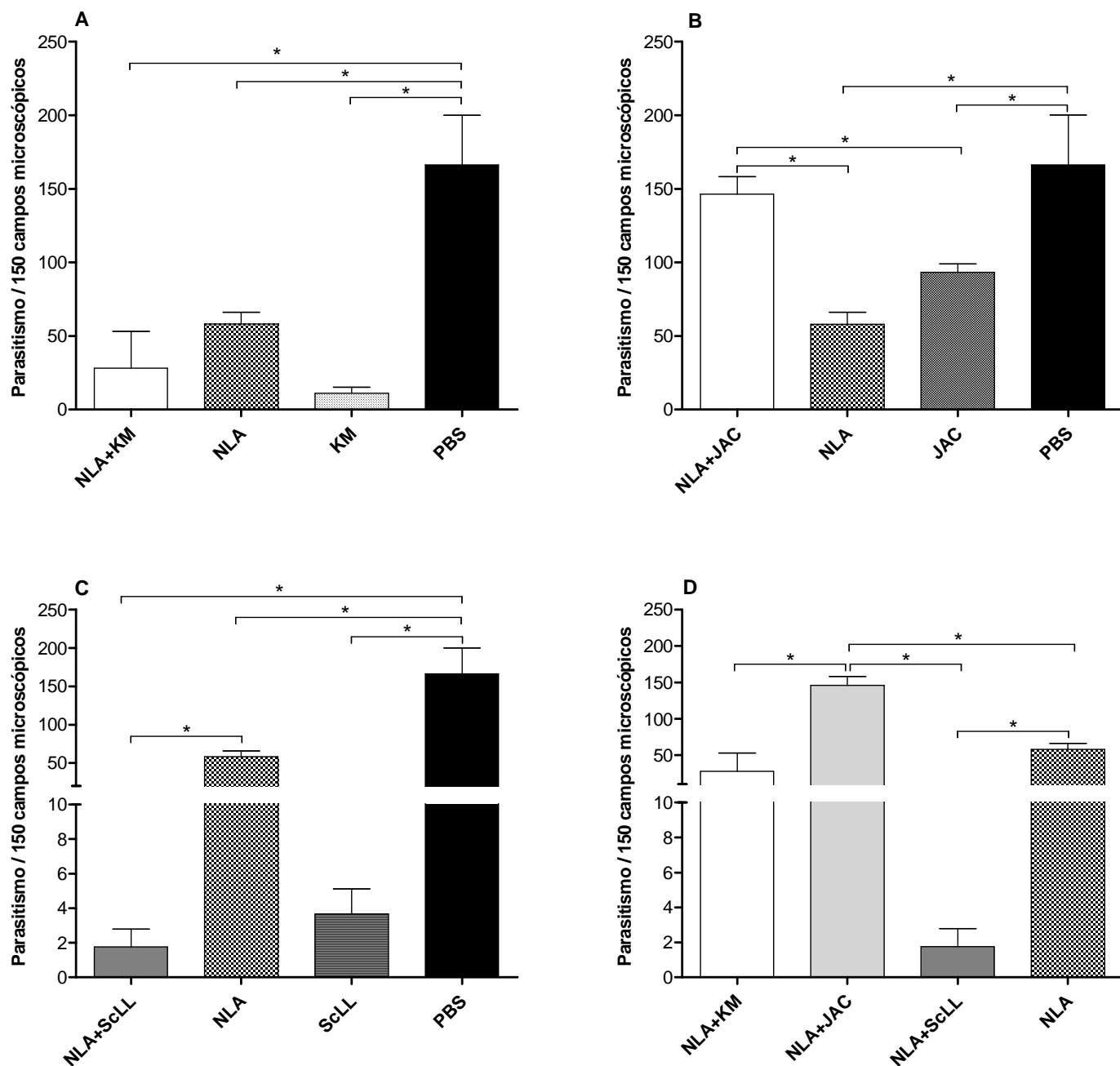
Após o desafio letal com taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum*, a carga parasitária cerebral nos camundongos sobreviventes após 30 dias de infecção foi determinada por PCR em tempo real (Figura 13) e a contagem de taquizoítas livres ou vacúolos parasitóforos foi realizada por imunohistoquímica (Figura 14).

Camundongos imunizados com NLA+KM, NLA e KM demonstraram menor carga parasitária cerebral em relação ao grupo PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 13A). Para a lectina JAC, observou-se alta carga parasitária nos animais imunizados com NLA+JAC, que foi significativamente maior em relação aos grupos NLA e JAC, mas semelhante ao grupo PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 13B). Os animais imunizados com a lectina ScLL, associada ou não com NLA, demonstraram a menor carga parasitária cerebral em relação ao grupo PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 13C). Na comparação realizada entre os grupos de lectinas associadas ao NLA, foi observado que os animais imunizados com NLA+KM e NLA+ScLL apresentaram a menor carga parasitária cerebral, enquanto animais imunizados com NLA+JAC tiveram a maior quantidade de parasitos no tecido cerebral em relação aos demais ( $p < 0,05$ ) (Figura 13D).

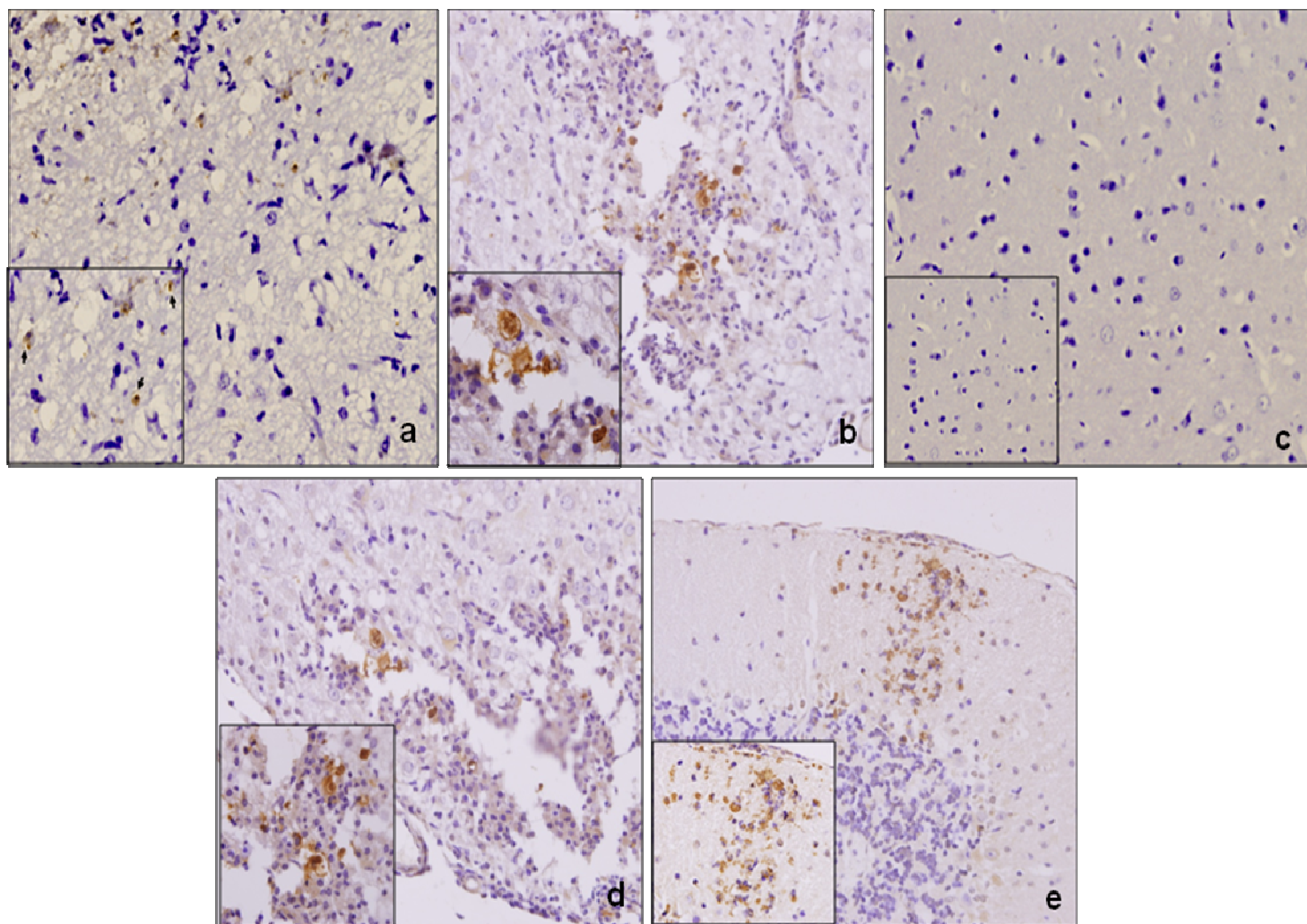
A análise de imunohistoquímica para detecção do parasitismo cerebral mostrou um padrão muito semelhante ao observado pelo PCR em todos os grupos (Figura 14). Os animais imunizados com NLA+KM, NLA e KM demonstraram menor parasitismo tecidual em relação ao grupo PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 14A). Foi detectado maior parasitismo nos camundongos imunizados com NLA+JAC em relação aos respectivos grupos controles, exceto para o grupo PBS, que mostrou maior quantidade de parasitos no tecido cerebral em relação aos grupos NLA e JAC ( $p < 0,05$ ) (Figura 14B). Para o grupo da lectina ScLL, o mais baixo parasitismo cerebral foi observado nos camundongos imunizados com ScLL e NLA+ScLL em relação aos respectivos controles, sendo o maior parasitismo encontrado nos animais do grupo PBS ( $p < 0,05$ ) (Figura 14C). Na comparação realizada entre os grupos de lectinas associadas com NLA, observou-se ainda que o grupo NLA+JAC apresentou o maior parasitismo tecidual em relação aos demais ( $p < 0,05$ ), enquanto o grupo NLA+ScLL mostrou o mais baixo parasitismo, embora sem diferença significativa com NLA+KM (Figura 14D). A figura 15 ilustra fotomicrografias representativas dos grupos imunizados com NLA associado ou não com as lectinas e o grupo PBS para fins de comparação. Nos grupos NLA+JAC e PBS, principalmente, nota-se intensa imunocoloração de taquizoítas e vacúolos parasitóforos de *N. caninum*.



**Figura 13.** Carga parasitária cerebral, determinada por PCR em tempo real, em camundongos sobreviventes após desafio com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum* dos grupos imunizados com o antígeno NLA associado ou não com as lectinas  $KM^+$  (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os três grupos de lectinas também está representada (D). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  (testes de Kruskal-Wallis e de comparação múltipla de Dunn).



**Figura 14.** Parasitismo em tecido cerebral, determinado por imunohistoquímica, em camundongos sobreviventes após desafio com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum* dos grupos imunizados com o antígeno NLA associado ou não com as lectinas KM<sup>+</sup> (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os três grupos de lectinas também está representada (D). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  (ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).



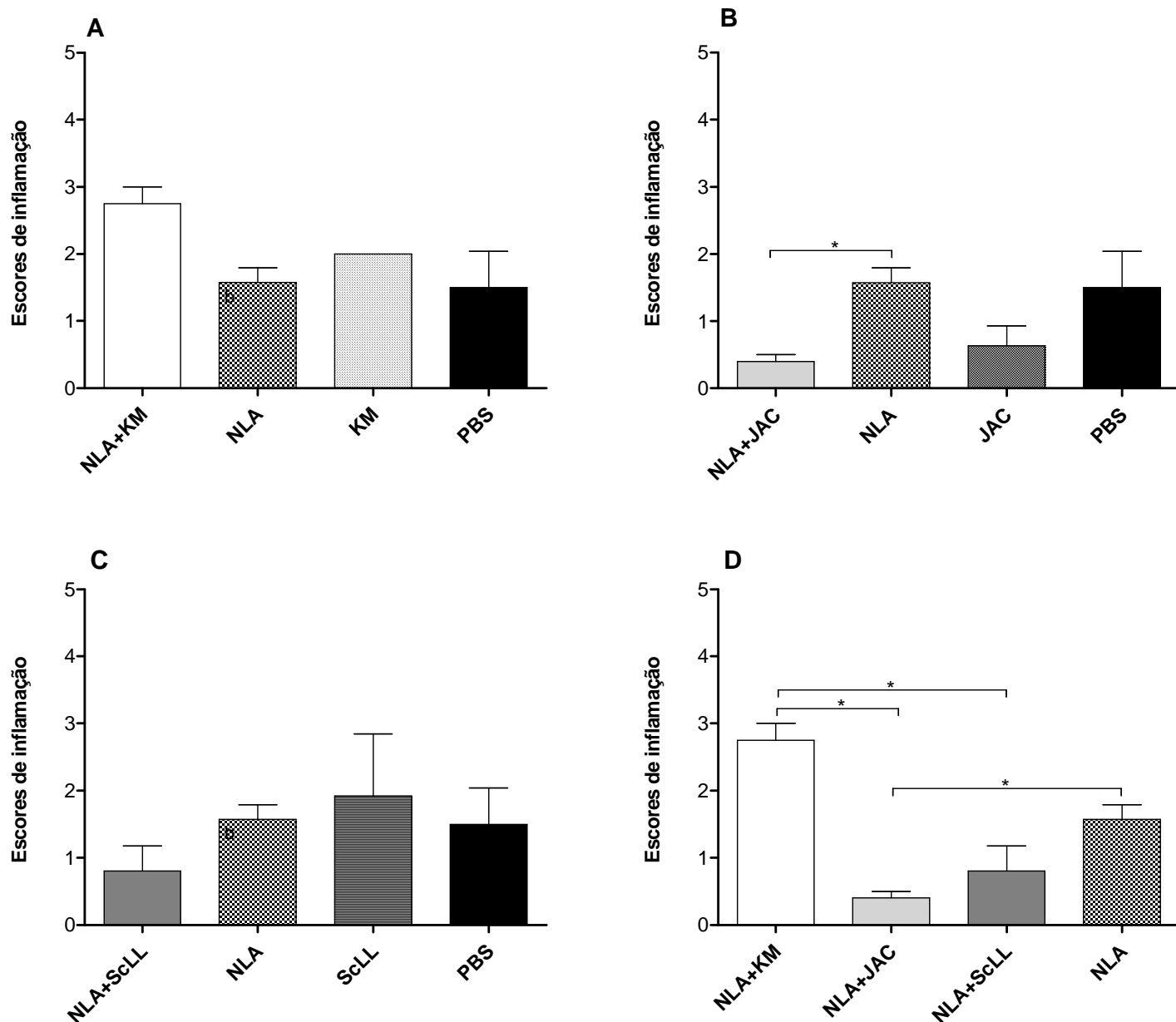
**Figura 15.** Fotomicrografias representativas da análise imunohistoquímica de cérebros de camundongos dos grupos NLA+KM (a), NLA+JAC (b), NLA+ScLL (c), NLA (d) e PBS (e), mostrando taquizoítas e vacúolos parasitóforos de *N. caninum* corados. As preparações foram coradas com DAB e hematoxilina de Harris foi utilizada para contracoloração. Aumentos de 400X (quadro maior) e 1000X (quadro menor).



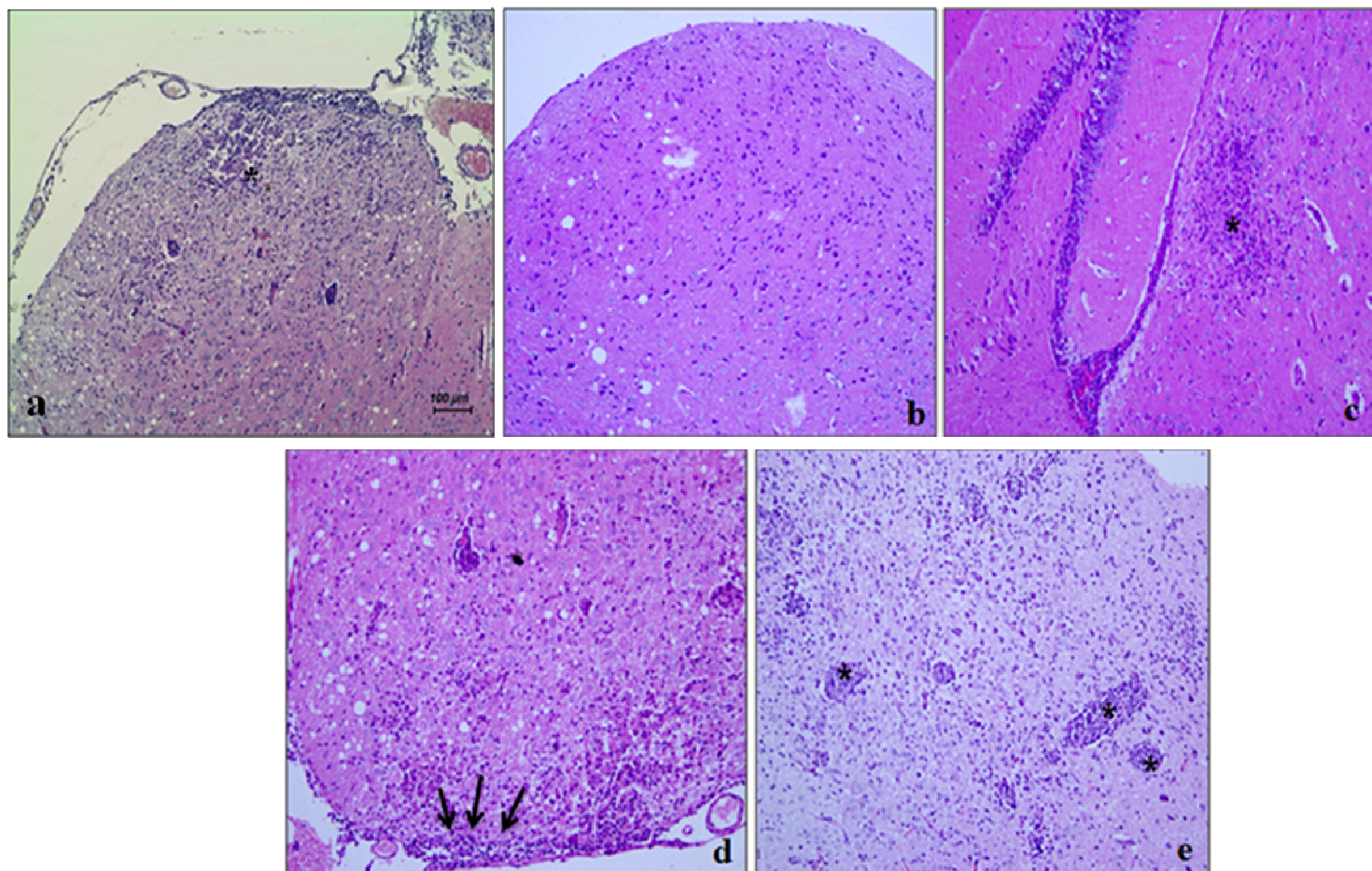
## 5.6 Análise histopatológica

Após 30 dias do desafio letal com taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum*, análise histopatológica de tecido cerebral foi realizada para determinação dos escores de inflamação tecidual (Figura 16) e fotomicrografias representativas de cada grupo estão demonstradas na figura 17. As lesões foram caracterizadas por infiltrados de células mononucleadas organizadas em focos (nódulos gliais) no SNC, presença de manguito perivascular e infiltrados inflamatórios focais nas meninges de alguns animais. Infiltrados inflamatórios difusos também foram verificados e quantificados.

Os camundongos imunizados com NLA+KM não apresentaram diferenças significativas nos escores de inflamação tecidual em comparação com os grupos NLA, KM e PBS (Figura 16A). O grupo NLA+JAC apresentou escores de inflamação mais baixos em relação ao grupo NLA ( $p < 0,05$ ) e este não apresentou diferenças significativas em relação aos demais grupos (JAC e PBS) (Figura 16B). Os animais imunizados com o grupo da lectina ScLL não apresentaram escores inflamatórios significativamente diferentes entre si (Figura 16C). Na análise dos grupos imunizados com NLA associado ou não com as lectinas, observou-se os maiores escores de inflamação para o grupo NLA+KM, seguido pelos grupos NLA, NLA+ScLL e NLA+JAC, com diferenças significativas apenas para o grupo NLA+KM em relação aos grupos NLA+JAC e NLA+ScLL, e para o grupo NLA em relação ao NLA+JAC ( $p < 0,05$ ) (Figura 16D).



**Figura 16.** Escores de inflamação tecidual de cérebros de camundongos após desafio com  $2 \times 10^7$  taquizoítas do isolado Nc-1 de *N. caninum* dos grupos imunizados com o antígeno NLA associado ou não com as lectinas  $KM^+$  (A), JAC (B), ScLL (C) e respectivos controles. A comparação entre os três grupos de lectinas também está representada (D). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os escores de inflamação são representados como unidades arbitrárias: 0 – 1, suave; 1– 2, moderado; 2,1– 3, grave; e acima de 3, muito grave. \* $p < 0,05$  (ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni).



**Figura 17.** Fotomicrografias representativas da análise histopatológica de cérebros de camundongos dos grupos NLA+KM (a), NLA+JAC (b), NLA+ScLL (c), NLA (d) e PBS (e), mostrando infiltrados de células mononucleadas organizadas (\*) e presença de infiltrados inflamatórios focais na meninge (setas). As preparações foram coradas com hematoxilina-eosina. Aumentos de 100X.

*Discussão*



## 6. DISCUSSÃO

*Neospora caninum* é reconhecido como importante causa de doença neuromuscular em cães e aborto em bovinos em todo o mundo. A neosporose provoca um sério impacto econômico nas indústrias de corte e de leite (REICHEL; ELLIS, 2009). Existem três principais opções de controle para neosporose no rebanho:

1. tratamento ainda hipotético com parasiticida contra o protozoário;
2. abordagem de “teste e abate”, onde animais infectados são identificados e eliminados do rebanho;
3. estratégia de vacinação.

A partir dessas opções, análises econômicas sugerem que a vacinação pode ser a abordagem mais efetiva e benéfica em termos de custo para controlar a neosporose (REICHEL; ELLIS, 2009). Até o presente momento, já foram realizados vários estudos sobre o assunto enfocando diferentes estratégias de vacinação.

Estudos prévios têm utilizado taquizoítas vivos (LÚNDEN et al., 2002), gama-irradiados (RAMAMOORTHY et al., 2006), atenuados por altas passagens em cultura celular (BARTLEY et al., 2008) ou proteínas recombinantes, como NcSRS2 e NcSAG1 (CANNAS et al., 2003; NISHIKAWA et al., 2000), NcSAG4 e NcGRA7 (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009), GRA1, GRA2 e MIC10 (HALDORSON et al., 2005), entre outros. Entretanto, essas estratégias de vacinação parecem ser menos efetivas do que o esperado, mostrando eficácia relativamente baixa ou proteção parcial, ou são pouco viáveis financeiramente para utilização como estratégias de vacinação de rebanho.

Outros estudos têm empregado diferentes antígenos nativos, como o lisado total de taquizoítas de *N. caninum* (LIDDELL et al., 1999; LUNDÉN et al., 2002; ROJOMONTEJO et al., 2011) ou antígenos excretados-secretados de *N. caninum* (NcESA), mostrando níveis variados de proteção de camundongos desafiados com o parasito (RIBEIRO et al., 2009). Em nosso estudo prévio, foi demonstrado que NLA combinado com o adjuvante ODN-CpG aumenta a proteção contra a infecção por *N. caninum* em camundongos, enquanto a imunização com NcESA resulta em forte resposta imune celular associada a altos níveis de IFN- $\gamma$  e inflamação, tornando os camundongos mais susceptíveis ao desafio letal com o parasito (RIBEIRO et al., 2009). Dessa forma, a natureza do antígeno candidato tem importante influência no êxito da imunização.

Além da natureza do antígeno, uma vacinação efetivamente protetora também depende de sua via de administração. Um recente estudo demonstrou que a via intra-

nasal foi mais efetiva do que a intraperitoneal para a administração de apenas um determinado antígeno recombinante, recNcPDI, para a proteção de camundongos contra a infecção por *N. caninum* (DEBACHE et al., 2009).

É importante ressaltar também, além do antígeno candidato e da via de administração adotada, que o adjuvante utilizado nas diferentes estratégias de vacinação pode acelerar, prolongar e aumentar as respostas imunes específicas ao antígeno. Nesse contexto, alguns estudos já utilizaram adjuvantes conhecidos como o adjuvante de Freund, ISCOMS, toxinas da cólera, ODN-CpG, dentre outros (DEBACHE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009). Porém, estudos utilizando proteínas de plantas como adjuvantes na imunização contra infecções, particularmente a neosporose, são escassos na literatura, apesar do reconhecimento proteína-carboidrato ser extremamente necessário para vários processos intracelulares, incluindo as respostas imunológicas (VASTA, 2009). Lectinas são proteínas ligantes de carboidratos com potencial papel para este fim, já que elas possuem uma ação crucial na proteção contra vários parasitos e vírus (ALBUQUERQUE et al., 1999; PANUNTO-CASTELO et al., 2001; FRANÇOIS, 2010). No presente estudo, o efeito adjuvante e o potencial imunestimulador de três lectinas de plantas, KM<sup>+</sup> e Jacalina de *Artocarpus integrifolia*, e ScLL de *Synadenium carinatum*, foram avaliados na imunização de camundongos contra a infecção por *N. caninum*.

A lectina KM<sup>+</sup> possui afinidade por manose e já é conhecida por induzir resposta imune do tipo Th1, com produção de IL-12p40 por macrófagos (PANUNTO-CASTELO et al., 2001) e indução da ativação de neutrófilos, com liberação de seus mediadores inflamatórios e aumento de suas funções efetoras (TOLEDO et al., 2009). Recentemente, foi sintetizada uma forma recombinante da proteína KM<sup>+</sup> e ambas as formas (nativa e recombinante) têm sido extensamente investigadas na infecção pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos BALB/c (COLTRI et al., 2008). Nesse modelo experimental, tanto a forma recombinante como a nativa contribuem para a obtenção de resposta imune do tipo Th1, com alta produção de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (NO). Dessa forma, camundongos tratados profilaticamente com KM<sup>+</sup> apresentaram níveis mais baixos de parasitismo no pulmão e menor incidência de granuloma (COLTRI et al., 2008).

Apesar de ter sido originada da mesma planta de KM<sup>+</sup>, a lectina Jacalina possui afinidade por GalNAc (N-acetil galactosamina) e apresenta ações imunoreguladoras. Um estudo mostrou que na infecção por HIV, interações dependentes de glicosilação da

Jacalina com o receptor CD45 nas células TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup>, elevam a sinalização mediada pelo TCR, induzindo a secreção de IL-2, que por sua vez, aumenta a ativação dos linfócitos T e secreção de citocinas tanto do tipo Th1 como Th2 (BABA et al., 2007).

A lectina ScLL, ao contrário das demais, é originada do látex da planta *Synadenium carinatum* e possui afinidade por D-galactose, assemelhando-se à Jacalina. Entretanto, ela apresenta diferentes atividades, dependendo do modelo experimental em estudo. Primeiramente, ela foi descrita como uma lectina que possui atividade pró-inflamatória, com habilidade de induzir resposta imune do tipo Th1 em camundongos BALB/c imunizados contra *Leishmania amazonensis* (AFONSO-CARDOSO et al., 2007). Já em modelos murinos de asma, a administração oral de ScLL foi capaz de inibir significativamente o extravasamento de neutrófilos e eosinófilos na inflamação aguda e crônica, aumentar a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, e diminuir os níveis das citocinas IL-4 e IL-5, sugerindo que ScLL pode modular o tráfego e a atividade de leucócitos através da produção de citocinas (ROGÉRIO et al., 2007).

No presente estudo, a imunização de camundongos utilizando a lectina KM<sup>+</sup> como adjuvante associada ao NLA, induziu a produção de altos níveis de IgG total anti-*N. caninum* pelos animais, quando comparados com o grupo da Jacalina e ScLL como adjuvantes. A lectina KM<sup>+</sup> associada ao NLA também foi capaz de aumentar a produção de IgG total em relação ao grupo imunizado apenas com antígeno, demonstrando sua capacidade de sinergismo com o antígeno, aumentando sua imunogenicidade e oferecendo um maior efeito adjuvante em relação às demais lectinas. Por outro lado, os camundongos imunizados com NLA associado com ScLL, apesar de produzirem IgG total em menor quantidade que o grupo da lectina KM<sup>+</sup>, também apresentaram níveis mais elevados desse anticorpo em relação ao antígeno isoladamente, em todos os tempos analisados. Além disso, os animais imunizados com NLA+ScLL apresentaram os mais altos níveis do isotipo IgG1 na maior parte do tempo, e ainda maiores que aqueles produzidos pelo grupo NLA+KM, embora o perfil cinético da produção de IgG1 foi semelhante para ambos os grupos. A Jacalina foi a única lectina associada ao NLA que não induziu produção de IgG1 mais elevada que o antígeno isoladamente, demonstrando que o antígeno NLA pode ser capaz de promover um tipo de resposta humoral relacionado ao perfil Th2.

Analisando o isotipo IgG2a, foi nítida a diferença entre as respostas dos animais imunizados com NLA+KM comparado com os demais grupos de lectinas, mostrando

que  $KM^+$  foi capaz de induzir resposta imune humoral relacionada ao tipo Th1 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001; TOLEDO et al., 2009).

Comparando os isotipos IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* antes e após o desafio letal com o parasito, foi possível observar que a resposta de IgG1 é significativamente maior do que a de IgG2a, em todos os grupos imunizados com o antígeno, associado ou não com as lectinas. Dessa forma, a resposta humoral relacionada ao perfil Th2 parece ser mais dependente do antígeno do que das lectinas. Porém, após o desafio, foram observados níveis significativamente maiores de IgG2a em soros de camundongos imunizados apenas com  $KM^+$ , sugerindo seu papel imunomodulador para resposta humoral relacionada ao tipo Th1. De forma interessante, foi verificado um aumento significativo na razão IgG2a/IgG1 após o desafio nos grupos NLA+KM e NLA+ScLL e, mais notadamente, no grupo KM, demonstrando uma tendência dessas lectinas para uma resposta imune humoral associada ao tipo Th1 após o desafio com *N. caninum*, enquanto o antígeno NLA isoladamente tende a conduzir para resposta humoral associada ao tipo Th2. Esses achados estão de acordo com um estudo prévio utilizando NLA associado com o adjuvante ODN-CpG que mostrou um considerável aumento de ambos os isotipos IgG1 e IgG2a depois do desafio em todos os grupos imunizados com o antígeno, indicando que o parasito também foi capaz de induzir tanto respostas imunes humorais associadas ao tipo Th1 como Th2, embora o tipo de resposta predominante seja do tipo Th2 (RIBEIRO et al., 2009).

Embora a Jacalina seja originada da mesma planta que a  $KM^+$  e tenha a mesma especificidade que a ScLL, ela não demonstrou atividade adjuvante significativa, já que o grupo imunizado com NLA+JAC apresentou níveis de IgG1 e IgG2a semelhantes ou ainda menores do que o grupo NLA, além de não aumentar significativamente os níveis de IgG2a após o desafio. Em outro estudo, porém, o efeito adjuvante da Jacalina, na mesma dose utilizada no presente estudo (100  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ), foi demonstrado pelo aumento da produção de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* gerados em camundongos imunizados com formas epimastigostas do parasito associadas à Jacalina (ALBUQUERQUE et al., 1999).

A imunocoloração diferencial vista nos ensaios de imunofluorescência indireta e o padrão antigênico exibido no *immunoblot* reforçam esses resultados sorológicos, sugerindo que a escolha do adjuvante influencia na magnitude da resposta imunológica. Assim, uma resposta imune humoral mais forte induzida por NLA associado com  $KM^+$ , seguido pelos grupos NLA+ScLL, NLA e NLA+JAC foi evidenciada por RIFI



enquanto diferentes padrões antigênicos exibidos no *immunoblot* sugerem que a magnitude de reconhecimento dos antígenos é diferente para cada grupo, sendo que NLA+KM reconhece mais fortemente antígenos de peso molecular intermediário, enquanto NLA+ScLL e NLA reconhecem mais fortemente antígenos de peso molecular mais alto.

A análise da produção de citocinas por células do baço dos camundongos imunizados após a estimulação antigênica *in vitro* mostrou que a lectina KM<sup>+</sup> associada com NLA induziu os mais altos níveis de IFN- $\gamma$ , enquanto as lectinas JAC e ScLL associadas ao NLA não foram capazes de produzir níveis de IFN- $\gamma$  diferentes daquele produzido pelo antígeno isoladamente. Um estudo prévio demonstrou que KM<sup>+</sup> induz grande produção de IL-12p40 por macrófagos e IFN- $\gamma$  por células do baço de camundongos BALB/c, sendo capaz de alterar o tipo de resposta imune do tipo Th2 para Th1 contra antígenos de *Leishmania major*, resultando em potente resposta mediada por células e, conseqüentemente, no controle da infecção (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

Surpreendentemente, os níveis de IL-10 produzidos pelas células estimuladas *in vitro* com o antígeno NLA foram ainda maiores do que aqueles produzidos pelas células estimuladas com o mitógeno ConA. Estes dados demonstram o potencial do antígeno NLA em exercer um papel imunoregulador. Estudos prévios, entretanto, relataram que na imunização de camundongos com NLA ou com proteínas recombinantes de *N. caninum* associados ou não com diferentes adjuvantes, a produção de IL-10 foi relativamente baixa com nenhuma diferença significativa entre os grupos analisados (RIBEIRO et al., 2009; AGUADO-MARTINEZ et al., 2009). Estas diferenças podem estar relacionadas com variações no tipo de antígeno ou até mesmo na preparação dos antígenos solúveis totais de *N. caninum*. De maneira interessante, células do baço de animais imunizados com apenas ScLL produziram altos níveis de IL-10, assemelhando-se ao grupo NLA, sendo que ScLL foi a lectina que mais induziu a produção de IL-10 sem estar associada ao antígeno NLA. Estudos prévios mostraram que ScLL foi capaz de inibir a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , um regulador negativo do fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B, sugerindo assim possuir um papel imunorregulador (ROGÉRIO et al., 2007).

Quando a razão IFN- $\gamma$ /IL-10 foi analisada, observou-se que a lectina KM<sup>+</sup> associada ao NLA induziu os maiores níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, alcançando a maior

razão IFN- $\gamma$ /IL-10 em relação aos demais grupos de lectinas e NLA isoladamente. Por outro lado, a lectina ScLL associada ao NLA induziu níveis intermediários dessas citocinas, mas levando a uma razão IFN- $\gamma$ /IL-10 maior do que aquela dos grupos NLA+JAC e NLA, os quais apresentaram a mais baixa razão IFN- $\gamma$ /IL-10. Esses resultados sugerem que a lectina KM<sup>+</sup> como adjuvante associada ao antígeno é capaz de modular a produção de citocinas após a imunização, direcionando a resposta imune para um perfil pró-inflamatório do tipo Th1, já que o antígeno NLA, isoladamente, tende a produzir uma resposta anti-inflamatória ou imunorreguladora, o que também foi observado para a lectina Jacalina.

Um padrão de resposta do tipo Th1 parece ser mais apropriado para o êxito da imunização contra *N. caninum*, apesar de estudos prévios demonstrarem que a vacinação com o antígeno NcESA sozinho ou associado ao adjuvante ODN-CpG resultou em uma forte resposta imune celular, associada com altos níveis de IFN- $\gamma$  e inflamação, levando os camundongos a se tornarem mais susceptíveis ao desafio (RIBEIRO et al., 2009). O padrão de resposta imune observado no presente estudo pode ter influenciado na sobrevivência, alterações de peso e morbidade dos animais, carga parasitária cerebral e inflamação tecidual após o desafio com *N. caninum*. Camundongos do grupo NLA+KM apresentaram a maior taxa de sobrevivência em comparação com os demais, e baixa carga parasitária cerebral, indicando que maiores níveis de anticorpos IgG2a antes do desafio, maior razão IgG2a/IgG1 após o desafio, e maior resposta de IFN- $\gamma$  podem ser responsáveis pela proteção contra a infecção. Entretanto, esses animais apresentaram os maiores escores de morbidade, alterações de peso corporal e escores de inflamação tecidual comparados com os grupos de animais imunizados com NLA+JAC, NLA+ScLL e NLA. Um estudo que avaliou o potencial da lectina KM<sup>+</sup> na imunização contra *Leishmania amazonensis* mostrou que a associação de KM<sup>+</sup> com o antígeno solúvel de *L. amazonensis* (SLA) induziu a produção de IFN- $\gamma$ , diminuindo assim a carga parasitária, mas sem diminuir o tamanho da lesão (TEIXEIRA et al., 2006). Portanto, é possível relacionar o padrão de resposta pró-inflamatório após o desafio no grupo NLA+KM com a maior razão IFN- $\gamma$ /IL-10, conduzindo à forte resposta imune celular na fase aguda da infecção. Porém, após o desafio, os animais desse grupo ainda apresentaram maior produção de IgG1 em relação à IgG2a, apesar da razão IgG2a/IgG1 aumentar consideravelmente. Esses resultados sugerem que a resposta imune tendendo ao perfil Th1 foi protetora contra o desafio letal

por *N. caninum*. Estudos futuros deverão ser conduzidos para avaliar o padrão de secreção de citocinas e o parasitismo tecidual em outros órgãos, como o fígado e o pulmão de camundongos desafiados, na fase aguda da infecção.

Animais imunizados com NLA+ScLL apresentaram sobrevida intermediária, escores moderados de morbidade e alterações de peso, baixa carga parasitária cerebral e baixos escores de inflamação tecidual em relação aos demais grupos. Além disso, eles apresentaram alta razão IFN- $\gamma$ /IL-10, embora menor em relação ao grupo NLA+KM e maior em relação aos grupos NLA+JAC e NLA. Os camundongos imunizados com o antígeno NLA associado à lectina ScLL apresentaram aumento da razão IgG2a/IgG1 após o desafio com *N. caninum*, apesar de apresentarem os maiores níveis de IgG1 anti-*N. caninum* em relação aos demais. Esses resultados sugerem um papel da ScLL com tendência a um perfil Th1, porém com atividade menos inflamatória que a KM<sup>+</sup>, e estão de acordo com estudos prévios que demonstram diferentes papéis para a lectina ScLL, dependendo do modelo experimental a ser pesquisado (AFONSO-CARDOSO et al., 2007; ROGÉRIO et al., 2007).

Por outro lado, camundongos imunizados com NLA+JAC apresentaram baixos escores de morbidade e alteração de peso corporal, com taxa de sobrevivência intermediária como observado para o grupo NLA isoladamente. Além disso, o grupo NLA+JAC apresentou a mais alta carga parasitária cerebral e os mais baixos escores de inflamação tecidual. Esses resultados podem ser explicados pela baixa razão IFN- $\gamma$ /IL-10 desse grupo, direcionando a resposta para um perfil imunorregulador, como também pela baixa razão IgG2a/IgG1 após o desafio, já que os animais desafiados desse grupo não foram capazes de aumentar significativamente a resposta de IgG2a contra o parasito. Em estudos prévios, porém, o efeito da imunização de camundongos com Jacalina associada a epimastigotas de *T. cruzi* foi avaliado e a carga parasitária dos animais vacinados foi reduzida em relação ao grupo imunizado apenas com o parasito, quando estes foram desafiados com tripomastigotas (ALBUQUERQUE et al., 1999). O grupo controle JAC apresentou escores intermediários de morbidade, perda de peso corporal e de sobrevivência e maior carga parasitária cerebral, porém com baixos escores de inflamação, sugerindo que a resposta imunológica nesses animais contra *N. caninum* não foi efetiva.

Surpreendentemente, os animais imunizados com as lectinas KM<sup>+</sup> e ScLL isoladamente apresentaram baixas cargas parasitárias cerebrais, menores ou similares àquelas detectadas quando em associação com NLA, embora apresentassem moderados

escores de inflamação tecidual após o desafio. Esses resultados sugerem que essas lectinas podem conter efeito imunestimulador sem necessidade da presença do antígeno, demonstrando possuírem um papel também na imunidade inata. Outros trabalhos indicam que o tratamento com  $KM^+$  recruta e ativa células da imunidade inata, como os neutrófilos, possibilitando um efeito imunestimulador (TOLEDO et al., 2009), como também confere proteção contra *P. brasiliensis*, sendo bom alvo de estudo para novas terapias (COLTRI et al., 2008). Ambos os estudos indicaram um mecanismo de ação de  $KM^+$  dependente do receptor Toll-like 2 para produção de IL-12. Mais recentemente, a administração profilática de  $KM^+$ , tanto na forma nativa como recombinante, mostrou proteção contra *P. brasiliensis*, com redução da carga fúngica e da incidência de granuloma em associação com aumento dos níveis de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO, promovendo uma resposta imune protetora do tipo Th1 (COLTRI et al., 2010).

Estudos também demonstraram a possibilidade da utilização de ScLL como terapia em doenças alérgicas, como a asma, já que sua administração reduziu a patologia associada à doença por mecanismos independentes de NO (ROGÉRIO et al., 2007). Por outro lado, um estudo recente mostrou que ScLL reduziu o crescimento de formas amastigostas de *L. amazonensis* em macrófagos murinos, por mecanismo independente de NO, induzindo a expressão das citocinas IL-12, IL-1 e TNF- $\alpha$  (AFONSO-CARDOSO et al., 2011). Como esperado, o grupo controle PBS apresentou a mais baixa sobrevivência associada com alta carga parasitária, semelhantemente ao grupo NLA+JAC, com escores intermediários de morbidade e alterações de peso e moderada inflamação após desafio letal com *N. caninum*.

Dessa forma, as lectinas  $KM^+$  e ScLL induziram proteção parcial contra o desafio letal por *N. caninum* e redução na carga parasitária cerebral, embora por mecanismos distintos. Enquanto  $KM^+$  induziu uma resposta imune pró-inflamatória direcionada para o perfil Th1, com maiores escores de morbidade e inflamação tecidual nos animais desafiados, ScLL induziu um perfil de resposta menos inflamatório, com baixos escores de morbidade e inflamação tecidual.

## . CONCLUSÕES

- i.** As lectinas KM<sup>+</sup> e ScLL foram capazes de aumentar a imunogenicidade do antígeno NLA na imunização de camundongos contra neosporose, pela indução de maiores níveis séricos de IgG total anti-*N. caninum* quando comparado com os grupos imunizados apenas com o antígeno e com NLA+JAC. A lectina KM<sup>+</sup> induziu maiores níveis do isotipo IgG2a, enquanto ScLL induziu maiores níveis do isotipo IgG1 em relação aos outros grupos;
- ii.** A imunização de camundongos com o antígeno NLA associado às lectinas KM<sup>+</sup> ou ScLL induziu resposta imune celular caracterizada por alta razão IFN- $\gamma$ /IL-10, direcionando para um perfil de resposta pró-inflamatória do tipo Th1, enquanto a imunização apenas com NLA ou com NLA+JAC induziu resposta com baixa razão IFN- $\gamma$ /IL-10, direcionando para um perfil de resposta anti-inflamatória;
- iii.** As lectinas KM<sup>+</sup> e ScLL promoveram redução na carga parasitária cerebral, embora com um perfil de resposta mais inflamatório, com maiores escores de morbidade e inflamação tecidual nos animais desafiados e imunizados com a lectina KM<sup>+</sup>, e um perfil de resposta mais anti-inflamatório, com baixos escores de morbidade e inflamação tecidual nos animais imunizados com a lectina ScLL.
- iv.** As lectinas KM<sup>+</sup> e ScLL mostraram ser adjuvantes satisfatórios ao antígeno NLA e apresentaram efeito imunoestimulador por conferir proteção parcial aos camundongos imunizados e desafiados com dose letal de *N. caninum*, enquanto a lectina Jacalina não produziu efeito adjuvante suficiente na imunização contra a infecção por *N. caninum*.

*Referências bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO-CARDOSO, S. R.; RODRIGUES, F. H.; GOMES, M. A. B.; SILVA, A. G.; ROCHA, A.; GUIMARÃES, A. H. B.; CANDELORO, I.; FAVORETO JR., S., SOUZA, M.A.; FERREIRA, M. S. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 45, n. 4, p. 255-266, 2007.
- AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; SOUZA, M. A. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, New York, v. 128, n. 1, p. 61-67, 2011.
- AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ALVAREZ-GARCÍA, G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; RISCO-CASTILLO, V.; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L. M. Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 27, n. 52, p.7331-7338, 2009.
- ALBUQUERQUE, D. A.; MARTINS, G. A.; CAMPOS-NETO, A.; SILVA, J. S. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 68, p. 375–381, 1999.
- ANTONY, A.; WILLIAMSON, N. B. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 51, n. 5, p. 232-237, 2003.
- BABA, M.; MA, B. Y.; NONAKA, M.; MATSUIISHI, Y.; HIRANO, M.; NAKAMURA, M.; WASAKI, N.; KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T. Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 81, p. 1002-1011, 2007.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.218, n.11, p.1803-1806, 2001.
- BARBER, J. S.; TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 28, n. 1, p. 57-64, 1998.
- BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. **Parasitology**, Cambridge, v.135, n. 4, p.421-432, 2006.

- BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. **Parasitology**, Cambridge, v.135, n. 1, p.13-21, 2008.
- BJËRKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.
- BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 546-552, 2002.
- BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. C.; KASPER, L. H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 4, p.535-544, 2006.
- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.12, p.117-118, 1964.
- CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; FERREIRA, P.; DA COSTA, J.M.C.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with semem in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induced neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, n. 1-3, p.109-114, 2006.
- CANNAS, A.; NAGULESWARAN, N.; MÜLLER, N.; EPERON, S.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG-1 and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. **Parasitology**, Cambridge, v. 126, n.4, p.303-312, 2003.
- CHO, J.; CHUNG, W.; SONG, K.; NA, B.; KANG, S.; SONG, C.; KIM, T. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v.43, n.1, p. 19-25, 2005.
- COBEA. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo:Winner, 1996. 259 p.
- COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PINZAN, C. F.; VENDRUSCOLO, P. E.; MARTINEZ, R.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of KM<sup>+</sup> lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a Toll-like receptor 2-dependent mechanism. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 173, n. 2, p. 423-432, 2008.
- COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; RUAS, L. P.; VENDRUSCOLO, P. E.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Medical Mycology**, London, v. 48, n. 6, p. 792-799, 2010.



CORBEAU, P.; HARAN, M.; BINZ, H.; DEVAUX, C. Jacalin, a lectin with anti-HIV-1 properties, and HIV-1 gp120 envelope protein interact with distinct regions of the CD4 molecule. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 31, p. 569-575, 1994.

COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; UZEDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; ARAÚJO, F.R.; McALLISTER, M.M., GONDIM, L.F.P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate host of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v.38, n. 2, p.157-159, 2008.

DEBACHE, K.; GUIONAUD, C.; ALAEDDINE, F.; HEMPHILL, F. Intraperitoneal and intra-nasal vaccination of mice with three distinct recombinant *Neospora caninum* antigens results in differential effects with regard to protection against experimental challenge with *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology**, London, v. 137, p. 229–240, 2009.

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

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; McALLISTER, M. M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 32, n. 8, p. 929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and the experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; OTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v.20, n.2, p.323-367, 2007.

EASTICK, F. A.; ELSHEIKHA, H. M. Stress-driven stage transformation of *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 106, n. 5, p. 1009-1014, 2010.

FERNANDES, B. C.; GENNARI, S. M.; SOUZA, S. L.; CARVALHO, J. M.; OLIVEIRA, W. G.; CURY, M. C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais-Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 33-40, 2004.

FRANÇOIS, K. O.; BALZARINI, J. Potential of Carbohydrate-Binding Agents

As Therapeutics Against Enveloped Viruses. **Medicinal Research Reviews**, cidade, Epub ahead of print DOI 10.1002/med.20216

FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chickens and embryonated eggs. **Parasitology**, London, v.134, n. 14, p.1931-1939, 2007.

GONDIM, L. F.; GAO, L.; McALLISTER, M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.

GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 33-39, 2005.

GRAHAM, D. A.; CALVERT, V.; WHYTE, M.; MARKS, J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. **The Veterinary Record**, London, v. 144, n. 24, p. 672-673, 1999.

HALDORSON, G. J.; MATHISON, B. A.; WENBERG, K.; CONRAD, P. A.; DUBEY, J. P.; TREES, A. J.; YAMANE, I.; BASZLER, T. V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. **International Journal for Parasitology**, New York, v.35, n.13, p.1407-1415, 2005.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, London, v.133, n. 3, p. 261-278, 2006.

INNES, E. A.; WRIGHT, S.E.; MALEY, S. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Journal for Parasitology**, New York, v.31, n.13, p. 1523-1534, 2001.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 212, n. 2, p. 193-211, 1998.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

- LASRI, S.; De MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 25-32, 2004.
- LIDDELL, S.; JENKIN, M.C.; COLLICA, C.M.; DUBEY, J.P. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 6, p.1072-1075, 1999.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.
- LOBATO, J.; SILVA, D. A.; MINEO, T. W.; AMARAL, J. D.; SEGUNDO, G. R.; COSTA-CRUZ, J. M.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; MINEO, J. R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington DC, v. 13, n.1, p. 84-89, 2006.
- LUNDÉN, A.; WRIGHT, S.; ALLEN, J.E.; BUXTON, D. Immunization of mice against neosporosis. **International Journal Parasitology**, New York, v. 32, n.7, p.867-876, 2002.
- McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLIS, R. A.; McGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, 1998.
- McALLISTER, M. M.; WALLACE, D. Reduce your herd's risk of *Neospora* abortions. The keys are controlling dogs and protecting our feed supplies. **Hoards Dairyman**, p. 438, 1999.
- MINEO, J. R.; SILVA D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.
- MINEO, T. W.; ALENIUS, S.; NASLUND, K.; MONTASSIER, H. J.; BJORKMAN, C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 188-192, 2006.
- MOORE, D.P. Neosporosis in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 87-97, 2005.
- MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, Berlin, v.100, n. 3, p.633-636, 2007.

NAM, H.; KANG, S.; CHOI, W. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.

NISHIKAWA, Y.; IKEDA, H.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Immunisation of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, n. 11, p.1167-1171, 2000.

NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, Amsterdam, v.19, n.11-12, p.1381-1390, 2001a.

NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKA, H.; MIKAMI, T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. **Vaccine**, Amsterdam, v.19, n.13-14, p.1710-1716, 2001b.

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

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; FERNANDEZ, E.C.; CERRILLO, J.R.; GARAGALZA, C.U, ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

OTSUKA, Y.; MIKAMI, T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. **Vaccine**, Amsterdam, v.19, n.13-14, p.1381-1390, 2001.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, J. S. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, England, v. 11, n. 12, p. 1035-1042, 2001.

PANADERO, R.; PAINCEIRA, A.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; PAZ, A.; DÍAZ, P.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; FERNÁNDEZ, G.; LAGO, N.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Research in Veterinary Science**, London, v. 88, n. 1, p. 111-115, 2010.

PARÉ, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 213, n. 11, p. 1595-1598, 1998.

PATITUCCI, A. N.; PHIL, M.; PÉREZ, M. J.; ROZAS, M. A.; ISRAEL, K. F. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, p. 252-255, 2001.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; VAN DAMME, E. J. Artin M: a rational substitution for the names artocarpin and KM<sup>+</sup>. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 114-115, 2008.

PERLÉ, K. D. M.; DEL PIERO, F.; CARR, R. F.; HARRIS, C.; STROMBERG, P. C. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, n.3, p. 252-255, 2001.

PETERSEN, E.; LEBECH, M.; JENSEN, L.; LIND, P.; RASK, M.; BAGGER, P.; BJORKMAN, C.; UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 2, p. 278-280, 1999.

PINEAU, N. P.; AUCOUTURIER, J. C.; BRUGIER, J. L.; PREUD'HOMME, P. Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 80, p. 420-425, 1990.

PINITKIATISAKUL, S.; MATTSSON, J.G.; WIKMAN, M. Immunisation of mice against neosporosis with recombinant NcSRS2 iscoms. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.129, n.1-2, p. 25-34, 2005.

QUINN, H.E.; MILLER, C.M.; 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**, New York, v. 34, n. 6, p. 723-732, 2004.

RAMAMOORTHY, S.; LINDSAY, D.S.; SCHURIG, G.G.; BOYLE, S.M.; DUNCAN, R.B.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHAN, N. Vaccination with gamma-irradiated *Neospora caninum* tachyzoites protects mice against acute challenge with *N. caninum*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v.53, n.2, p.151-156, 2006.

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**, New York, v. 39, n. 11, p.1173-1187, 2009

RIBEIRO, D. P., FREITAS, M. M. P., CARDOSO, M. R. D., PAJUABA, A. C. A. M., SILVA, N. M., MINEO, T. W. P., SILVA, J. S., MINEO, J. R., SILVA, D. A. O. CpG-ODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 27, n. 19, p. 2570-2579, 2009.

ROGÉRIO, A. P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, E. V. G.; KOYAMA, N. S.; BASEI, F. L.; SOARES, E. G.;

CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L. H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, England, v. 17, n. 8, p. 795–804, 2007.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; O RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; PRENAFETA, A.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, p. 220–229, 2011.

ROQUE-BARREIRA, M. C.; PRAZ, F.; HALBWACHS-MECARELI, L.; GREENE, L. J.; CAMPOS-NETO, A. IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. **Brazilian Journal of Medical Research**, São Paulo, v.19, p.149-157, 1986.

ROSA, J. C.; OLIVEIRA, P. S. L.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GREENE, L. J. KM<sup>+</sup>, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: Amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the b-prism fold. **Protein Science**, New York, v. 8, p. 13–24, 1999.

SÁNCHEZ, G. F.; MORALES, S. E.; MARTÍNEZ, M. J.; TRIGO, J. F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 67, n. 2, p. 142-145, 2003.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S. M. O.; BELTRAMINI, L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal of Immunology**, Oxford, v.153, n.4, p.1798-1807, 1994.

SERRANO, F.; FERRE, L.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTINEZ, R.; ATXAERANDIO, C.; HIDALGO, O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.135, n. 3-4, p.197-203, 2006.

SILVA, D. A. O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.

SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, New York, v. 126, n. 2, p. 167-77, 2010.

SOUZA, M.A.; AMANCIO-PEREIRA, F.; BARROS-CARDOSO, C.R.; GOMES-SILVA, A.; SILVA, E.G.; ANDRADE, L.R.; PENA, J.D.O.; LANZA, H.; AFONSO-CARDOSO, S.R. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 705-716, 2005.

SPILOVSKÁ, S.; REITEROVÁ, K.; KOVÁCOVÁ, D.; BOBÁKOVÁ, M.; DUBINSKÝ, P. The first finding of *Neospora caninum* and the occurrence of other abortifacient agents in sheep in Slovakia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 164, n. 2-4, p. 320-323, 2009.

TAIMI, M.; DORNAND, J.; NICOLAS, M., MARTI, J.; FAVERO, J. Involvement of CD4 in interleukin-6 secretion by U937 monocytic cells stimulated with the lectin jacalin. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 55, n. 2, p. 214-220, 1994.

TEIXEIRA, C. R.; CAVASSANI, K. A.; GOMES, R. B.; TEIXEIRA, M. J.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; CAVADA, B. S.; SILVA, J. S.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, n. 15, p.3001-3008, 2006.

THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis – like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.1,n .3, p. 205-209, 1989.

TOLEDO, K. A.; SCWARTZ, C.; OLIVEIRA, A. F.; CONRADO, M. C. A. V; BERNARDES, E. S.; FERNANDES, L; C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, G.; MORENO, A. N. Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 123, p. 14-20, 2009.

TRANAS, J.; HEINZEN, R. A.; WEISS, L. M.; McALLISTER, M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.; JAKUBEK, E.B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.

VASTA, G. R., Roles of galectins in infection. **Nature Review Microbiology**, London, v. 7, n. 6, p. 424-438, 2009.

WILLIAMS, D. J. L.; TREES, A. J. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum* infected cattle. **Parasite Immunology**, Oxford, v.28, n.3, p. 61-67, 2006.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A. M. H.; van MAANEN, C.; BRINKHOF, J. M. A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1677-1682, 1999.

YU, X.; CHEN, N.; HU, D.; ZHANG, W.; LI, X.; WANG, B.; KANG, L.; LI, X.; LIU, O.; TIAN, K. Detection of *Neospora caninum* from Farm-Bred Young Blue Foxes (*Alopex lagopus*) in China. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 71, n. 1, p. 113–115, 2009.

## ANEXO 1



**Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)**

---

Campus Santa Mônica, Bloco 1J  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)  
Telefone: 3239.4531

Uberlândia, 23 de março de 2009

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o Comitê de Ética na Utilização de Animais, CEUA, iniciou seus trabalhos de avaliação e monitoração de pesquisas em janeiro de 2008. Portanto, o projeto intitulado "Potencial imunestimulatório de lectinas de plantas (*Artocarpus integrifolia* e *Synadenium carinatum*) na imunização de camundongos contra infecção por *Neospora caninum*, cuja responsável é Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, quando iniciado não possuía um comitê para analisá-lo. Contudo, após avaliação do projeto, o CEUA informa que o protocolo encontra-se aprovado segundo seu regimento.

Por ser verdade, firmo à presente.

---

Alcino Eduardo Bonella