



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**ATIVAÇÃO DE VIAS INTRACELULARES DEPENDENTES DE PI3K E p38
REGULA A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS MURINOS FRENTE À
INFECÇÃO POR *Neospora caninum***

CAROLINE MARTINS MOTA

UBERLÂNDIA - MG
- 2013 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**ATIVAÇÃO DE VIAS INTRACELULARES DEPENDENTES DE PI3K E p38
REGULA A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS MURINOS FRENTE À
INFECÇÃO POR *Neospora caninum***

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

Caroline Martins Mota

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

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

UBERLÂNDIA - MG
- 2013 -

M917a Mota, Caroline Martins, 1986-
2013 Ativação de vias intracelulares dependentes de PI3K e p38 regula a
resposta de macrófagos murinos frente à infecção por *Neospora caninum* /
Caroline Martins Mota. – 2013.
85 p. : il.

Orientador: José Roberto Mineo.

Coorientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.

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

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Neosporose - Teses. 3. Neospora – Teses. I.
Mineo, José Roberto. II. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Agradecimientos

À Deus, por me guiar e estar sempre presente na minha vida, me dando força, coragem e saúde pra superar os obstáculos da vida. Pela oportunidade de conhecer e conviver com pessoas especiais que contribuem para que meu dia seja único.

Aos meus pais, por ser exemplo de amor, dedicação e carinho, por me ouvir e aconselhar, pelo colo que consola, por ser fortalecedor os momentos com vocês e por sempre estarem comigo.

As minhas irmãs, ávos, tios (as) e primos (as) por me apoiarem e compreenderem os momentos de ausência.

Ao meu namorado Alessandro pela compreensão e carinho. Por sempre estar ao meu lado independente das circunstâncias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Mineo por ser um pai científico, que me acolheu quando iniciei minha carreira científica e ensinou a amar a ciência, pela atenção e paciência nos momentos de dificuldades.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por me esilar a sempre buscar mais na pesquisa, por tudo que já me ensinou, pela dedicação e enorme paciência em ensinar.

A Dra. Deise A. O. Silva, que me ensinou a ter responsabilidade na realização dos experimentos, e por ser exemplo profissional, de caráter e competência.

Aos queridos amigos e companheiros de laboratório Cristina Rostkowska, Profa. Dra. Fernanda Maria Santiago, Ana Carolina de Moraes Oliveira, Patrício Barros Cardoso, Silas Santana Silva, Fernando Reis pelo “ombro amigo”, por toda conversa e ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia Prof. Dr. Marcelo, Profa. Dra. Mônica, Murilo, Flavinha, Laura, Elivaine, Zé, Amanda, Vanessa, Mylla, Maraísa Tamires, Miguel, Gebrim, Lorenzo, Arlindo pela amizade, paciência, convívio, conhecimentos compartilhados e pelos importantes socorros nos momentos de dúvidas.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Marley, Zilda, Ana Cláudia e Edilge pelo apoio na rotina laboratorial, na realização dos experimentos, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao secretário Max pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas.

As secretárias da pós-graduação, Lucileide e Lucélia, pelos conselhos valiosos, pela amizade e por sempre estarem disponíveis em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Alergia, Prof. Dr. Jair Jr., Isabella, Leandro, Bia, Leticia e Juliana pelo carinho e amizade oferecidas.

Aos meus amigos Marcela, Nerry, Patrícia, Sabrina, Everton, Cynthia, Tiago, Bruna, Angélica, Marina, Frederico pelos momentos inexplicáveis e incomparáveis.

Aos meus amigos e colegas de sala pelos desabafos, por toda ajuda nas pequenas e grandes coisas, pelas confidências.

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido à aquisição de material e reagentes para a execução deste trabalho, em especial a CAPES, pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

RESUMO

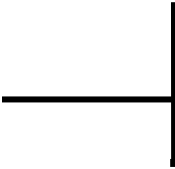
Devido à alta prevalência e importância econômica da neosporose, o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes contra este parasito é crucial para limitar abortos e transmissão vertical em bovinos, bem como para controlar a disseminação de oocistos pelos cães. Pouco se sabe sobre a resposta imune inata induzida por *Neospora caninum*, contudo depreende-se de modelos experimentais semelhantes que a ativação das diferentes vias de sinalização intracelulares nestas células são fundamentais para a indução de uma resposta imunológica que restrinja a infecção. Nesse contexto, o objetivo principal deste estudo foi determinar o papel das Proteínas Tirosina Quinase Ativadas por Mitógenos (MAPKs) p38, JNK e ERK1/2 em macrófagos durante infecção com *Neospora caninum*. A ativação das MAPKs frente a infecção foi observada em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) estimulados com taquizoítos vivos e diferentes frações antigênicas de *N. caninum*, que demonstrou uma alta fosforilação da MAPK p38 em momentos iniciais. Com a intenção de avaliar o papel biológico das MAPKs durante a infecção com *N. caninum*, BMDMs foram pré-tratados com inibidores químicos específicos. A inibição química de p38 levou a um aumento na produção de IL-12 e na expressão das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86, aliado a uma redução nos níveis de IL-10. A relevância destes dados foi testada *in vivo*, sendo observado que o desafio de camundongos tratados com o inibidor químico de p38 reduz a carga parasitária cerebral associado a um aumento na capacidade proliferativa de esplenócitos. Com a intenção de se desenvolver parcialmente o mecanismo molecular envolvido na indução de p38, foram conduzidos experimentos adicionais que demonstraram que o perfil de citocinas induzido pela inibição de p38 em BMDMs é induzido por PI3K. Desta forma, os resultados aqui contidos demonstram que *N. caninum* manipula a via PI3K/p38 em seu favor, a fim de regular negativamente a resposta imune inata do hospedeiro. Assim, bloquear esta via de sinalização pode ser útil para o desenvolvimento de uma nova vacina ou tratamento contra neosporose.

Palavras-chave: *N. caninum*, macrófagos derivados da medula óssea, p38, IL-12.

ABSTRACT

Due to the high prevalence and economic importance of neosporosis, the development of safe and effective vaccines against this parasite is crucial to limit abortions and vertical transmission in cattle, as well as to control the spread of oocysts by dogs. Little is known about the innate immune response induced by *Neospora caninum*, however it follows similar experimental models which activates different intracellular signaling pathways in these cells being critical for the induction of an immune response that restricts the infection. In that sense, the major aim of this study was to determine the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) signaling p38, JNK and ERK1/2 in macrophages during infection by *Neospora caninum*. The activation of MAPKs against infection was observed in bone marrow derived macrophages (BMDMs) stimulated with live tachyzoites and different antigenic fractions of *N.caninum*, which demonstrated a high phosphorylation of p38 MAPK in the early stages. In order to evaluate the biological role elicited by MAPKs during initial contact with *N. caninum*, BMDMs were pretreated with specific inhibitors. The chemical inhibition of p38 has led to an increased production of IL-12 and expression of co-stimulatory molecules CD80/CD86, coupled with a reduction in levels of IL-10. The relevance of these findings was tested *in vivo*, it was observed that the challenge of mice immunized with the chemical inhibitor of p38 reduces the parasitic brain load associated with increased proliferative capacity of splenocytes. Aiming to partially discover the molecular mechanism involved in the induction of p38 were conducted additional experiments that demonstrated that the cytokine profile induced by the inhibition of p38 in BMDMs is induced by PI3K. Thus, the results showed that *N. caninum* manipulates the PI3K/p38 pathway in its favor, in order to downregulate the host's innate immune responses. Therefore, interference in this signaling pathway may be useful for the development of a new vaccine strategy against neosporosis.

Keywords: *N. caninum*, bone marrow-derived macrophages, p38, IL-12.



Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>Neospora caninum</i>	13
1.1.1	Taxonomia	13
1.1.2	Ciclo biológico.....	13
1.1.3	Via de transmissão	15
1.1.4	Patogênese	16
1.1.5	Sinais clínicos	17
1.1.6	Epidemiologia e prevalência.....	18
1.1.7	Controle	17
1.2	Resposta imune	21
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Obtenção dos camundongos	32
4.2	Obtenção de parasitos	32
4.3	Preparação de antígenos de <i>Neospora caninum</i>	33
4.3.1	Antígeno solúvel de lisado total	33
4.3.2	Antígenos excretados-secretados (ESA).....	33
4.4	Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	34
4.5	Mensuração da ativação inicial das MAPKs em BMDMs estimulados com <i>Neospora caninum</i> ou NLA ou ESA	34
4.6	Ensaio de citotoxicidade	35
4.7	Quantificação de citocinas	36
4.8	Mensuração da expressão de moléculas co-estimulatórias e do complexo principal de histocompatibilidade em BMDMs.....	37
4.9	Protocolo de imunização.....	37
4.10	Quantificação de IgG e subclasses específicos para <i>N. caninum</i>	38
4.11	Avaliação da proliferação de esplenócitos	38
4.12	Desafio	39
4.13	PCR em tempo real	39
4.14	Análise estatística	40

4.15 Normas de biossegurança	40
5 RESULTADOS	42
5.1 <i>N. caninum</i> e seus antígenos induzem a fosforilação da MAPK/p38 macrófagos murinos	42
5.2 Baixa citotoxicidade dos inibidores de MAPKs em BMDMs.....	45
5.3 <i>N. caninum</i> ativa MAPK/p38 e modula a produção de citocinas IL-12p40 e IL-10, e a expressão de moléculas co-estimulatórias, mas não altera a expressão do complexo principal de histocompatibilidade em BMDMs.....	47
5.4 <i>N. caninum</i> ativa MyD88 e PI3K, e modula a produção das citocinas IL-12 p40 e IL-10 em BMDMs.....	50
5.5 Imunização de camundongos utilizando o inibidor farmacológico específico para p38 melhora a resposta imune adaptativa celular contra o desafio por <i>N. caninum</i> ...	54
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO I.....	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum*

1.1.1 Taxonomia

Neospora caninum é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, estreitamente relacionado ao protozoário *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 1988, 2011). Este parasito foi descrito pela primeira vez por Bjerkas et al. em 1984, na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos, paralisia dos membros posteriores, cistos teciduais morfológicamente distintos dos cistos de *T. gondii* e soronegativos para *T. gondii*.

Em 1988, *N. caninum* foi reconhecido como nova espécie e gênero ao se analisar cortes histológicos de cães com doença fatal sugestiva de toxoplasmose. Dubey e colaboradores encontraram características que o diferenciavam do quadro de toxoplasmose, constatou-se que este agente era capaz de provocar em cães um quadro clínico mais severo que *T. gondii* e que havia, de fato, diferenças estruturais, histopatológicas e eram negativos para *T. gondii* nos testes sorológicos e imunohistoquímicos (DUBEY; LINDSAY, 1993).

1.1.2 Ciclo biológico

N. caninum apresenta ciclo biológico heteroxeno, ou seja, o ciclo se desenvolve em hospedeiros distintos, subdivididos em fases sexuada e assexuada. A reprodução sexuada ocorre em canídeos (cão, coiote, dingo australiano) que são considerados hospedeiros definitivos (McALLISTER et al., 1999; GONDIM et al., 2004; KING et al., 2010), enquanto que a reprodução assexuada ocorre em vários hospedeiros intermediários, incluindo desde animais domésticos a animais silvestres, tais como: gatos, porcos, carneiros, cavalos, bovinos, búfalos, raposas, coiotes, lobos, alpacas, veados, camelos e psitacídeos (DUBEY; SCHARES & ORTEGA-MORA, 2007; MINEO et al., 2011).

O ciclo de vida (Figura 1) envolve três formas infecciosas: taquizoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos), sendo que todas as formas estão envolvidas na transmissão do parasito (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Oocistos não-esporulados (imaturos ou não infecciosos) são eliminados nas fezes de canídeos infectados. No ambiente, sob condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, levando ao desenvolvimento de oocistos esporulados, que contêm dois esporocistos dos quais cada um contém quatro esporozoítos (DUBEY, 2003).

Os hospedeiros intermediários tais como os bovinos, podem ingerir os oocistos esporulados encontrados em alimentos ou água contaminada e tornar-se infectados. Os esporozoítos são liberados no trato digestivo e invadem as células do epitélio intestinal, fibroblastos e leucócitos, multiplicando-se como taquizoítos que disseminam por todo organismo (ELLIS, 2013).

Taquizoítos residem em compartimentos intracelulares chamados vacúolos parasitóforos, replicam rapidamente por endodiogenia (um processo de desenvolvimento assexuado pelo qual duas células filhas se desenvolvem internamente dentro da célula mãe parasitada). Neste estágio o parasito pode invadir e infectar diversos tipos de células do hospedeiro, incluindo células neurais, macrófagos, fibroblastos, endotélio vascular, células musculares, e hepatócitos (BARR et al., 1994; DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos causam uma forte resposta inflamatória e destruição de tecidos e são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (fase aguda). Sob a pressão da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos transformam-se em bradizoítos que iniciam a segunda fase do desenvolvimento assexuado (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; ELLIS et al., 2010; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

Quanto aos bradizoítos, estes são formas de latência que se multiplicam lentamente por endodiogenia e vão formar os cistos teciduais, predominantemente em tecidos neurais e musculares, podendo persistir por toda vida do hospedeiro sem causar manifestações clínicas significativas (fase crônica), embora possa ocorrer uma baixa taxa de reativação espontânea (DUBEY et al., 1992).

O ciclo de vida é completado quando os cistos presentes nos tecidos de presas (por exemplo, em carne contaminada) são ingeridos por hospedeiros definitivos. A parede dos cistos é digerida por enzimas proteolíticas do hospedeiro definitivo,

liberando bradizoítos que invadem células epiteliais do intestino delgado e iniciam a fase sexuada (esquizogonia) como formação de esquizontes e liberação de merozoítas, os quais iniciam a gamogonia com a produção final de oocistos não esporulados que são eliminados com as fezes e o ciclo de vida começa novamente (TENTER; HECKEROTH ; WEISS, 2000; GONDIM et al., 2004; ELLIS et al., 2013).

1.1.3 Via de transmissão

A transmissão vertical tem sido demonstrada em vários hospedeiros (bovinos, carneiros, cabras, cães, gatos, camundongos, macacos e porcos) e é o principal modo de transmissão em bovinos. O parasito é transmitido da mãe para o feto via placenta durante sucessivas gestações, contribuindo significamente para a persistência da infecção no rebanho (Figura 1)(COLE et al., 1995; DUBEY; LINDSAY, 1993; MOSKWA et al., 2007).

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 alimentos contaminados (DUBEY, 2003).

Além disso, outras rotas secundárias de transmissão horizontal como lactogênica, venérea ou inseminação artificial têm sido investigadas e ainda não comprovadas (UGGLA et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 2003; MOSKWA et al., 2007).

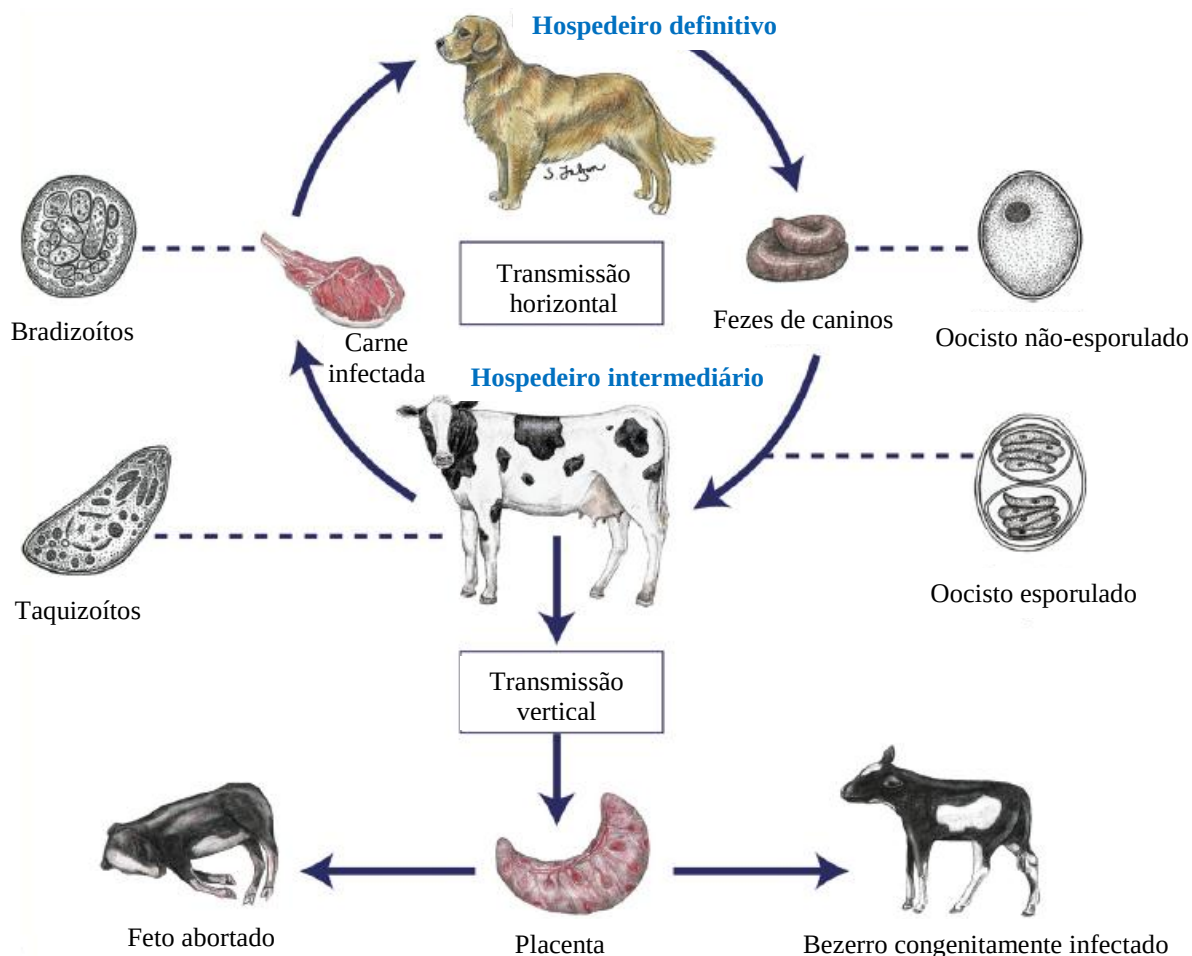


Figura 1 - Ciclo Biológico de *Neospora caninum*.
Fonte: Ellis (2013).

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 o complexo apical composto por micronemas, roptrias e grânulos densos, que são usados pelo parasito durante a adesão e invasão de células hospedeiras (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002). A invasão celular, dessa forma, é um mecanismo ativo que requer energia do parasito e pode ser resumida em três etapas:

A primeira etapa é caracterizada pela adesão inicial do parasito à célula hospedeira e ocorre por uma adesão aleatória do parasito, envolvendo antígenos de superfície imunodominantes (SAG). Após a adesão inicial, os parasitos posicionam a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana

da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas de micronemas (MIC) são secretadas e funcionam como adesinas, sendo responsáveis pela espessa zona de adesão de forma irreversível. E inicia-se o movimento de invasão celular que força-o para dentro do VP. A membrana plasmática da célula hospedeira é usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos (HEMPHILL; GOTTSTEIN, 1996; BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002; KELLER et al., 2002).

A segunda etapa é caracterizada pela secreção de proteínas de roptrias (ROP), 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 (BUXTON; McALLISTER; DUBEY, 2002).

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

Os taquizoítas dentro do VP proliferam por endodiogenia, produzindo novas gerações de parasitos em poucas horas 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 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, natimortos, além do nascimento de animais com sinais clínicos ou clinicamente normais, mas cronicamente infectados (DUBEY, 2003). Sinais clínicos são mais frequentes 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). A neosporose canina clínica pode ser localizada ou generalizada, com o envolvimento de todos os órgãos, inclusive da pele causando quadros cutâneos (PERLÉ et al., 2001; ORDEIX et al., 2002). Uma característica nestes casos é o intenso parasitismo com um grande número de taquizoítos nas lesões cutâneas, sugerindo uma falta de controle imune do hospedeiro sobre a multiplicação dos parasitos. Diferentemente dos bovinos, os cães podem ser afetados pela doença em qualquer fase da vida, sendo os casos mais graves da doença 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 (DUBEY, 2003). 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).

1.1.6 Epidemiologia e prevalência

A neosporose tem emergido como uma séria doença em bovinos e cães em todo o mundo (DUBEY, 2003) e a infecção em bovinos por *N. caninum* já foi relatada em todos os continentes (DUBEY; SCHARES & OTEGA-MORA, 2007; SPILOVSKÁ et al., 2009; YU et al., 2009; PANADERO et al., 2010). Abortos e mortalidade neonatal associados à neosporose também foram descritos em diversos países da América do Sul, como Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai, mostrando que 12 a 42% de fetos abortados de bovinos de leite estavam infectados por *N. caninum* (MOORE, 2005). No estado de Minas Gerais, há evidência sorológica que a infecção por *N. caninum* é amplamente distribuído na criação de caprinos, bovinos e cães (BRUHN et al., 2012; ANDRADE et al., 2012). Na região do Triângulo Mineiro, a soroprevalência de neosporose em rebanhos bovinos com problemas reprodutivos foi estimada em 17% (MINEO et. al., 2006).

No entanto, a prevalência da neosporose bovina varia dependendo do país, região, e entre bovinos de corte e de leite. Estas diferenças estão predominantemente relacionadas aos diversos fatores de risco (número de gestações, presença e número de cães na fazenda, idade do gado, entre outros) e proteção (número de oocistos ingeridos, etapa da gestação, resposta imunológica, entre outros), bem como o tipo de teste sorológico utilizado para determinar a exposição ou infecção (GOODSWEN; KENNEDY ; ELLIS 2013).

O problema do aborto em um rebanho pode persistir por vários meses ou anos (BASSO et al., 2010). Estudos epidemiológicos sugerem que a manutenção prolongada de infecção em um rebanho bovino não é principalmente pela transmissão transplacentária, mas requer de complemento, assim a infecção horizontal assume importância (FRENCH et al., 1999).

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

Infecções de animais selvagens por *N. caninum* já estão sendo comumente relatados, por exemplo, os cães selvagens são uma praga comum em fazendas, mas parece improvável que eles desempenham um papel na transmissão de *N. caninum* para o gado, pois os cães selvagens estão ainda a ser confirmados como a fonte de infecção (KING et al., 2011a). No entanto, cães de comunidades indígenas mostram alta soroprevalência e foi sugerido que a infecção pós-natal é comum nesses animais (KING et al., 2012). A identificação de um reservatório de vida selvagem ainda não foi determinada, mas a infecção parece ser comum em camundongos selvagens (BARRATT et al., 2008).

1.1.7 Controle

O controle ideal da infecção baseia-se 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). Atualmente, os medicamentos usados para o tratamento das infecções utilizam basicamente bases com potencial coccidiostático, como por exemplo toltrazuril. Contudo, tais drogas tem efeito comprovado apenas em taquizoítos, sendo que não há evidência dos seus efeitos em bradizoítos (REICHEL & ELLIS, 2002, 2009; WILLIAMS & TREES, 2006; DEBACHE et al., 2011).

Desse modo, a vacinação parece ser o meio mais viável economicamente para controlar a neosporose, já que o sacrifício de animais ou seus possíveis tratamentos demandariam maiores despesas para os criadores dos rebanhos (REICHEL & ELLIS, 2009, CARDOSO et al., 2011; 2012).

Até o presente momento, não há vacina capaz de induzir completa imunidade protetora contra o parasito em bovinos. Existe uma vacina disponível comercialmente (Bovilis NeoGuard®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, EUA), consistindo de taquizoítas inativados, mas com baixa eficácia demonstrada em ensaios de campo (REICHEL & ELLIS, 2009; WESTON, HEUER & WILLIAMSON, 2012). Ainda há diversos desafios a serem vencidos com a intenção de se desenvolver uma vacina com melhor aceitação do mercado, sendo que a vacina ideal deve proporcionar uma proteção contra não somente a infecção, mas também contra a doença clínica (REICHEL & ELLIS, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento de protocolos vacinais tem sido amplamente estudados, sendo os principais objetos de pesquisa a busca por novos antígenos protetores e modos de administração. O desenvolvimento de vacinas com antígenos totais, associados com diferentes adjuvantes, têm mostrado resultados contraditórios, variando desde 100% (LIDDELL et al., 1999) a proteção parcial (LUNDÉN et al., 2002) contra transmissão vertical em camundongos. As vacinas vivas, com base em cepas avirulentas de *N. caninum* isoladas em bovinos infectados naturalmente, têm se mostrado promissoras neste contexto (ROJO-MONTEJO et al, 2009a; WILLIAMS et al, 2007).

Por conseguinte, outro método que tem sido estudado é a utilização de vetores virais vivos para apresentar antígenos recombinantes (NISHIKAWA et al, 2001). Vários antígenos que foram identificados podem ser usados apresentação viral para o sistema imune de bovinos (REICHEL & ELLIS, 2009). No entanto, mesmo estas e outras novas vacinas com parasito vivo (MARUGAN-HERNANDEZ et al, 2011) irão encontrar dificuldades em entrar no mercado devido as preocupações sobre a distribuição, a reversão da virulência, e sua manipulação genética.

Para neosporose canina, as recomendações têm sido direcionadas no sentido de evitar colocar em reprodução cadelas soropositivas para *N. caninum*, bem como impedir sua 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 de fazendas (McALLISTER & WALLACE, 1999).

1.2 Resposta imune

Tanto a resposta imune inata como a resposta adaptativa participam dos mecanismos protetores contra *N. caninum*, de forma semelhante aos mecanismos descritos para o parasito estreitamente relacionado *T. gondii* (BUZONI-GATEL et al., 2006).

A fim de sobreviver e propagar, patógenos intracelulares devem ser capazes de modular uma variedade de funções das células hospedeiras. A resposta imune contra estes parasitos é conhecida por ser predominantemente Th1, com a produção de IL-12 e IFN- γ , e com a participação de respostas celulares efetoras na redução do parasitismo tecidual (KHAN et al., 1997; NISHIKAWA et al., 2001; PINHEIRO et al., 2010).

Dessa forma, a imunidade celular é o mais importante mecanismo na regulação da infecção por *N. caninum*, com a participação das células T CD4⁺ e T CD8⁺, macrófagos e células natural killer (NK). Durante a fase aguda da infecção, macrófagos e células dendríticas (DCs) produzem e secretam altos níveis de interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF- α) em resposta a alguns antígenos e proteínas liberados por taquizoítos (DENKERS & GAZZINELLI, 1998; HEGAB & AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005). A citocina IL-12 estimula as células NK a produzirem e secretarem altos níveis de interferon-gama (IFN- γ), além de induzir a diferenciação de células T

CD8⁺ e T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , que são citocinas críticas para a sobrevivência do hospedeiro (HEMPHILL, VONLAUFEN & NAGULESWARAN, 2006). Células infectadas são destruídas por células T CD8⁺, liberando taquizoítos que ficam acessíveis a vários mecanismos imunológicos, como anticorpos, complemento, macrófagos ativados e células NK (MINEO et al., 2009; MUNOZ, LIESENFELD & HEIMESAAT, 2011).

Outra citocina importante na regulação da resposta imune celular é a IL-10, produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária, apresenta efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos, diferenciação de clones Th1, produção de IFN- γ e IL-12 por células apresentadoras de antígeno (ABBAS, 2005; MINEO, et al., 2010; MURRAY & WYNN, 2011).

Os macrófagos (MØs) são células essenciais para o funcionamento adequado do sistema imune inato e adaptativo. Estas células possuem papel chave em diversos processos biológicos, tais como a apresentação e processamento antigênico, morte microbiana, modulação do perfil de produção de citocinas e depuração de células apoptóticas, entre outros (MARIM et al., 2010).

Estes eventos são ativados pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que se ligam aos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) de células do sistema imune inato, em grande parte expressos em células apresentadoras de antígeno (APCs). Um exemplo destes PRRs são os receptores do tipo Toll (TLRs), capazes de reconhecer várias classes de patógenos, incluindo membros do filo Apicomplexa, e desencadear uma cascata de sinalização culminando na produção de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (TAYLOR et al., 2005; MINEO et al., 2010; RODRÍGUEZ-PRADOS et al., 2010).

Os TLRs ao se ligarem aos PAMPs sofrem dimerização, a qual permite a ligação de proteínas adaptadoras e facilitam o recrutamento e ativação de várias proteínas quinases, levando à ativação de diferentes fatores de transcrição, que estimulam a expressão de genes e codificam diversos mediadores inflamatórios (AKIRA & TAKEDA, 2004). Em geral, as vias majoritárias ativadas por TLRs compreendem a via MyD88, Fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K), Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs), e I κ B(IKK) (AKIRA & TAKEDA, 2004).

Parasitas intracelulares, do filo Apicomplexa, *T. gondii* e *N. caninum*, manipulam a cascata de sinalização do hospedeiro durante a infecção intracelular em macrófagos

ou células dendríticas, de tal modo que modulam a resposta pró-inflamatória, representando uma estratégia de escape na imunidade inata (KIM et al., 2004).

Estudos mostram que a resistência de protozoários intracelulares é altamente dependente da produção de IL-12 por APCs (SCANGA et al., 2002). De acordo com a literatura, camundongos geneticamente deficientes para MyD88 (MyD88^{-/-}), uma proteína adaptadora importante na sinalização usada pelo receptor TLR, e infectados por *T. gondii* reduzem a resistência do hospedeiro e a produção de IL-12. Pois, a infecção deste animais com *T. gondii* resulta no aumento da replicação do parasito e na redução de IL-12, e a mesma resposta é observada em macrófagos peritoneais, neutrófilos e células dendríticas de animais MyD88^{-/-} estimulados com o antígeno solúvel de lisado total de *T. gondii* (STAg) (SCANGA et al., 2002). Em contraste, os camundongos Knockout para TLR2 (TLR2^{-/-}) e TLR4 (TLR4^{-/-}) produzem normalmente a citocina IL-12. Enquanto, o tratamento *in vivo* com a toxina pertussis (inibidor de receptor acoplado a proteína G) aboli a produção desta citocina como ocorrido nas células MyD88^{-/-} estimuladas com STAg (SCANGA et al., 2002). Este dados sugerem, que a indução de IL-12 por *T. gondii* depende de um mecanismo único envolvendo ambas vias de sinalização MyD88 e receptor acoplado a proteína G (SCANGA et al., 2002).

Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos deficientes para MyD88 infectados com *N. caninum* (MINEO et al., 2009). Esta susceptibilidade foi caracterizada por falha na produção de IL-12 por células dendríticas, atraso na resposta de IFN- γ por células NKT, CD4⁺ e CD8⁺ e na produção de elevados níveis de IL-10. Desse modo, a ativação de MyD88 por parasitos do filo Apicomplexa, tem um papel importante na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12, TNF- α e IFN- γ (STEVENSON & RILEY, 2004).

A ativação de MyD88 ocorre parcialmente pelo reconhecimento das moléculas do *N. caninum* por TLR2, uma vez que TLR2/MyD88 desencadeiam aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias, complexo principal de histocompatibilidade tipo I, ativação de célula T e produção de citocinas inflamatórias, como IL-12 em células dendríticas derivadas de médula óssea estimuladas com NLA ou infectadas com taquizoítos vivos do parasito. No entanto, animais TLR2^{-/-} não morrem durante a infecção por *N. caninum* como MyD88^{-/-}, embora prejudicada a função de apresentação antigênica nas APCs (MINEO et al., 2009; 2010). Portanto, há outros receptores envolvidos no reconhecimento dos PAMPs deste protozoário, podendo ser TLR11, pois profilina de *T. gondii* ligante de TLR11 também foi encontrada em *N. caninum* com

sequência homóloga (YAROVINSKY et al., 2005). E o soro de camundongos estimulados por 6 e 24 horas com profilina de *N. caninum* foram capazes de induzir IFN- γ e IL-12, semelhante ao observado em animais estimulados com profilina de *T. gondii* (YAROVINSKY et al., 2005; JENKINS et al., 2010). Nesse sentido, é possível especular que profilina de *N. caninum* através TLR11 tem papel na modulação da resposta imune inata, o que ajudaria a explicar o papel parcial de TLR2 na indução das respostas imunológicas contra infecção por *N. caninum*. E tem se observado que receptor acoplado a proteína G também é utilizado como estratégia de escape por este parasito, no qual camundongos estimulados com antígeno secretado-excretado por *N. caninum* (ESA) aumentam a população de monócitos CD11b⁺ na cavidade peritoneal quando comprado com o controle (não-estimulado). No entanto, a migração destas células são abolidas nos animais CCR5^{-/-} após estímulo antigênico. Assim, o ESA pode controlar o recrutamento de monócitos e células dendríticas derivadas da medula óssea de modo dependente ao CCR5. No entanto, o baço e fígado de camundongos CCR5^{-/-} apresentaram menor parasitismo após 3 dias de infecção (MINEO et al., 2010).

Dessa maneira, podem haver outras vias de sinalização que são vias de escapes de patógenos intracelulares. Estudos prévios demonstraram que a regulação na produção de citocinas inflamatórias podem também ocorrer por ativações das MAPKs. As três principais MAPKs conhecidas são quinases c-Jun-N-terminal (JNK), quinases reguladoras de sinal extracelular (ERK) e p38 (LU et al., 1999; KIM et al., 2004; BRUMLIK et al., 2011).

A fosforilação de ERK esta envolvida na resposta de fatores de crescimento; proliferação celular e diferenciação. Enquanto, a via JNK tem papel regulador de apoptose, transformação celular, ativação e diferenciação de células T, e produção de citocinas. Semelhante ao que ocorre com a ativação de p38, que foi proposto para função na regulação da produção de citocinas, proliferação e diferenciação de células B e controle do ciclo celular e apoptose (LU et al., 1999).

Há 4 isorformas de p38: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ . Estas proteínas quinases são ativadas pela fosforilação dos resíduos de treonina e serina quinases localizadas acima das MAPKs, MKK3 e MKK6, embora que MKK4 uma quinase importante na ativação de JNK, tem sido implicado na ativação da via p38, que irão mediar sinais regulatórios para as células (KIM et al., 2005). A utilização de drogas inibitórias das MAPKs, facilita o estudo destas vias nos diversos sistemas imunológicos (LU et al., 1999).

Conforme dados na literatura, observa-se que a modulação na produção de citocinas inflamatórias ocorre através da ativação da MAPK/p38 em macrófagos murinos estimulados com LPS por 6 horas, potente ativador de p38. Pois animais deficientes geneticamente para MKK3 (MKK3^{-/-}) ou células tratadas com inibidores farmacológicos de p38 e estimulados com LPS regulam negativamente a produção de IL-12 e IFN- γ (LU et al., 1999).

KIM e colaboradores (2004), mostra que a infecção pela cepa RH de *T. gondii* induz a fosforilação transitória da MAPK /p38 independente de MyD88 em macrófagos murinos, que é caracterizada por um aumento na produção de IL-12. No entanto, a cepa Me49 deste protozoário regula positivamente a produção desta citocina por ativação das MAPKs , ERK1/2 e p38 dependente de MyD88, e também através do reconhecimento do receptor acoplado a proteína G que recruta PI3K que irá ativar e fosforilar ERK1/2 (KIM et al., 2004).

As enzimas PI3Ks são expressas em todas as células de mamíferos e contribuem na proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, migração, fagocitose e produção de reativos de oxigênio (COSTA, GERMENA, HIRSCH, 2010; KIM & SURESH, 2013). Estas enzimas são membros de uma família única e bem conservada de quinases intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxila de fosfotidilinositol e fosfoinosítídeos (ENGELMAN, J. A., LUO, J., CANTLEY, 2006). Essa reação leva à ativação de várias via de sinalização, como as MAPKs. Estudos demonstraram que a fosforilação de PI3K regula positivamente a migração de células dendríticas, mas inibi a produção de IL-12 após estímulo destas células com LPS ou *T. gondii* (LIU et al., 2007) e a fosforilação desta via por tal protozoário inibe a apoptose das células infectadas (QUAN et al., 2013).

Desse modo, as vias de sinalização que modulam a função relativa de apresentação antígeno em APCs para *N. caninum* ainda são pouco conhecidas, portanto, entender o papel das MAPKs e PI3k na regulação da resposta imune inata frente a infecção por *N. caninum* pode contribuir para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas. Pois, a transdução de sinal desencadeada via PI3K e MAPKs podem ser vias de escape da resposta imune protetora do hospedeira pelo *N. caninum* (COSTA, GERMENA & HIRSCH, 2010).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo parasito 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 (CRAEYE et al., 2011; REICHEL et al., 2013). Esta estimativa de perdas globais devido *N. caninum*, devem servir de incentivo para o desenvolvimento de tratamento e / ou vacinas.

A vacina comercializada contra abortos causados por *N. caninum* mostraram baixa eficácia, provavelmente porque não foi capaz de desenvolver proteção suficiente em bovinos já infectados. A vacina deve ser capaz de quebrar o ciclo de transmissão e, assim, evitar a infecção do gado impedindo o contágio de uma nova geração de gado, e evitando os abortos também. Uma alternativa seria ter duas vacinas, uma para uma população não infectada contra a infecção primária, e outra que seja capaz de evitar a recrudescência do parasito e aborto em animais já infectados (REICHEL et al., 2013). Assim, a vacina ideal seria capaz de proteger contra a infecção e as doenças clínicas. Para isto é requerido considerável conhecimento da biologia do parasito, interação parasito-hospedeiro e uma compreensão dos importantes componentes da imunidade protetora e como eles são induzidos, para se poder identificar possíveis alvos de vacinas e drogas (GOODSWEN et al., 2013)

De um modo geral, os mecanismos inatos relacionados à resistência contra *N. caninum* ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que a participação de receptores da imunidade inata do tipo TLR2 é crucial para a resistência dos hospedeiros frente à infecção por este protozoário (MINEO et al., 2010). No entanto, a via de sinalização desencadeada que culmina na produção de mediadores inflamatórios ainda é pouco descrita para a neosporose e outros protozoários.

Portanto, o conhecimento acerca da resposta imune inata e adaptativa que o parasito desencadeia é necessário para o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra *N. caninum*, com a finalidade de prevenir abortos e transmissão vertical em bovinos e cães, bem como para controlar a disseminação de oocistos pelo hospedeiro definitivo.

Os monócitos, macrófagos e células dendríticas desempenham um papel importante no controle da neosporose, mas também podem contribuir para o estabelecimento de infecções. Descobertas recentes têm resultado numa significativa reavaliação do papel destas células hospedeiras durante infecções por protozoários, bem

como os que regulam as suas funções durante a infecção parasitária. Dada a importância cada vez mais reconhecida dos macrófagos em infecções causadas por protozoários, a modulação da resposta imune do hospedeiro tem grande potencial terapêutico (SHEEL & ENGWERDA, 2012).

Sendo assim, determinar outras vias de sinalização que o *N. caninum* desencadeia em macrófagos, como mecanismos de escape podem contribuir para o desenvolvimento de uma método terapêutico contra esta parasitose.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o papel das MAPKs na resposta imune de macrófagos murinos derivados da medula óssea, infectados por *N. caninum*, ou estimulados por seu antígeno solúvel (NLA) ou de secreção-excreção (ESA).

3.2 Objetivos específicos

A. Avaliar a ativação inicial das MAPK em macrófagos murinos estimulados com *N. caninum*;

B. Avaliar a ativação das MAPK em macrófagos murinos estimulados com parasitos vivos e diferentes frações antigênicas;

C. Observar o papel das MAPKs e das proteínas adaptadoras MyD88 e PI3k na indução da resposta de macrófagos murinos *in vitro*, através da utilização de inibidores farmacológicos ou depleção gênica;

D. Analisar o efeito das MAPKs *in vivo*, por meio de ensaios de imunização utilizando inibidores farmacológicos específicos das vias em estudo como adjuvantes em preparados vacinais, associados ou não a antígenos solúveis de *N. caninum*.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos camundongos

Camundongos C57BL/6 selvagem, com seis a dez semanas de idade, foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo mantidos no CBEA com água e ração *ad libitum*, em condições padronizadas de temperatura e umidade. Camundongos da mesma linhagem parental com depleções gênicas para PI3K e MyD88 foram obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, 1991). Os protocolos para utilização dos animais foram previamente aprovado pelo nosso Comitê de Ética Animal institucional (CEUA / UFU, protocolo número 029/12 – Anexo I).

4.2 Obtenção de parasitos

Os parasitos do isolado Nc-1 (DUBEY et al., 1988b) de *N. caninum* foram mantidos em passagens regulares em sistema de cultivo celular, utilizando-se células de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) como descrito anteriormente (RIBEIRO et al., 2009). As células 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) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad-CA, EUA) em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C até atingirem a confluência. Neste momento, as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum*, sendo estes replicados em uma nova monocamada a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados e parcialmente purificados por centrifugação rápida (45 x *g*, 1 minuto, 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado (700 x *g*, 10 minutos, 4°C) ou lavado por duas vezes com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS, pH 7,2). O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspensionado em PBS e os parasitos foram contados em câmara de

Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripan 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 a preparação do antígeno de secreção e excreção ou para os experimentos *in vitro* ou para o desafio dos animais.

4.3 Preparação de antígenos de *Neospora caninum*

4.3.1 Antígeno solúvel de lisado total

O antígeno solúvel de lisado total de *N. caninum* (NLA) foi preparado como descrito anteriormente (SILVA et al., 2007). Resumidamente, as suspensões parasitárias foram tratadas com coquetel de inibidores de proteases (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e submetidas a 10 ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C , seguido por oito ciclos de ultra-som (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) durante 30 segundos a 60 Hz, em banho de gelo. Após centrifugação ($10.000 \times g$, 30 min, 4°C), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (filtros Millex, Millipore, EUA), e a sua concentração protéica determinada pelo ensaio de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Alíquotas de NLA foram armazenadas a -20°C , até serem utilizadas na imunização de camundongos, estimulação *in vitro* de macrófagos e como antígeno em reações imunoenzimáticas (ELISA) na análise da resposta de anticorpos de camundongos imunizados.

4.3.2 Antígenos excretados-secretados (ESA)

Preparação do antígeno de secreção e excreção (ESA) de *N. caninum* foi obtida como anteriormente descrito (RIBEIRO et al., 2009). Taquizoítos de *N. caninum* foram ajustados para aproximadamente 1×10^8 taquizoítos/mL em solução salina de Hanks e incubados por 45 minutos a 37°C . Após centrifugação ($10.000 \times g$, 4°C , 30 min), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, EUA) e a sua concentração protéica determinada pelo ensaio de Bradford (Sigma-Aldrich) (BRADFORD, 1976). Alíquotas de ESA foram armazenadas -20°C até à sua utilização.

4.4 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Após a eutanásia, os camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e knockout para MyD88 e PI3K foram pulverizados com álcool 70% e, em câmara de fluxo laminar, seus fêmures e tíbias foram extraídos, dissecados, imersos em álcool 70% por 1 minuto e suas epífises cortadas. As medulas ósseas foram lavadas com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI 1640 incompleto e uma agulha de 26G de diâmetro. A suspensão celular obtida foi centrifugada (400 x *g*, 10 minutos, 4°C) e ressuspendida em meio R20/30, composto por meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina e 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM; MARIM, et al., 2010).

A suspensão celular foi distribuída igualmente em placas de Petri e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Quatro dias após a incubação, foi adicionado o mesmo meio condicionado R20/30, e as placas foram mantidas na estufa a 37°C e 5% CO₂ por mais 2 dias. No sexto dia, o sobrenadante das placas de Petri foi descartado e PBS gelado estéril foi adicionado a cada placa, sendo incubados a 4°C por 10 minutos para remoção das células. Por fim, as células foram centrifugadas a 400 x *g* por 10 minutos e o pellet obtido foi ressuspendido em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas de acordo com o layout experimental.

4.5 Mensuração da ativação inicial das MAPKs em BMDMs estimulados com *Neospora caninum* ou NLA ou ESA

2 x10⁶ BMDMs foram plaqueados em placas de cultura de 12 poços em triplicata e incubados por 24 horas a 37°C e 5 % CO₂. Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoitos vivos de *N. caninum* (*Multiplicity of infection* - MOI 1) por 0, 15, 30, 60 e 120 minutos de infecção, ou estimuladas com NLA ou ESA por 30 minutos

A preparação das amostras foi feita de acordo com o protocolo do fabricante para as células aderentes (BD Biosciences, San Diego, EUA). Em resumo, as células foram lisadas por adição de tampão de desnaturação 5x contendo inibidores de protease e fosfatase. Em seguida, as amostras foram colocadas imediatamente em água fervente por 5 minutos e armazenadas á -70 °C até as vias fosforiladas pJNK 1/2 (T183/Y185),

pp38 (T180/Y182), e pERK 1/2 (T202/Y204) serem determinadas quantitativamente utilizando anticorpos a partir do *multiplex Flex Set Cytometric Bead Array* (BD Biosciences, San Diego, EUA). As diluições seriada dos padrões (1/2) foram preparados e os lisados celulares foram diluídos com tampão de ensaio e transferidos para tubo FACS. Em seguida, 25 µl do mix de beads de captura foram transferidos para cada um dos tubos. Após 3 h de incubação à temperatura ambiente, 25 µl do reagente de detecção PE foram adicionados e incubados por mais uma hora à temperatura ambiente. A reação realizada em tubo de FACS foi lavada com tampão apropriado e centrifugada a 200 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, foi adicionado 150 µl de tampão de lavagem/tubo. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCantoII, BD), sendo um total de 900 eventos adquiridos, seguindo o protocolo fornecido. A análise de citometria de fluxo foi realizada utilizando o *BD FACS Array Bioanalyzer* e análise do CBA pelo software FCAP (BD). Os níveis de detecção mínimos para cada proteína-fosfo foram de 0,38 U /ml para pJNK e 0,64 U/ml para pp38 e pERK (SCHUBERT et al., 2009). Os resultados demonstrados são representativos de um único experimento independente em triplicata.

4.6 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos inibidores de SB203580, SP600125 e PD98059 foi avaliada em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), utilizando a análise colorimétrica de tetrazólio metiltiazol (ensaio de MTT), como descrito por MOSMANN (1983).

BMDMs foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) em triplicata em meio de RPMI completo, na ausência ou presença de diferentes concentrações em diluições duplas seriadas dos inibidores SB203580 [inibidor de p38 (40-1,25 µM)] ou SP600125 [inibidor de JNK (40-1,25 µM)], ou PD98059 [inibidor de ERK (40-1,25 µM)], por 24 h a 37°C e 5% CO₂.

Como controle positivo de viabilidade, as células foram incubadas somente com meio. Após 3 h ou 24 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as células foram lavadas com meio e adicionados 10µL de tetrazólio de metiltiazol (MTT, Sigma Chemical Co.) na concentração de 5mg/mL em 90 µL de meio RPMI completo. Após 4 h de incubação, o sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram então solubilizadas com 100 µL/poço de solução 10% SDS e 50% N-dimetil formamida. Após a incubação

por uma noite para total solubilização dos cristais, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placas (M2e, Molecular Devices, Sunnyvale-CA, EUA)). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (100%). Foram realizados dois experimentos independentes.

O Wortimannim, inibidor de PI3K foi usado na concentração de 500nm em todos ensaios *in vitro* conforme dados na literatura (COSTA et al., 2010; QUAN et al., 2013).

4.7 Quantificação de citocinas

BMDMs de animais selvagem ou geneticamente deficientes para MyD88 e PI3k foram cultivados em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) em quadruplicata, com meio RPMI completo, na ausência ou presença dos inibidores SB203580 (10 μ M) ou SP600125 (10 μ M), ou PD98059 (10 μ M), ou Wortimannin (500nm) e incubados por 3 horas a 37°C e 5% CO₂, e posterior infecção com *N. caninum* (MOI 1). Após 24 horas de incubação as placas foram centrifugadas (200 x g/5 minutos), e o sobrenadante coletado e armazenado a -70°C para posterior análise por ELISA de citocinas. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes.

As dosagens das citocinas IL-10 e IL-12 foram realizadas pela técnica ELISA tipo sandwich, segundo os protocolos recomendados pelo fabricante (BD). Em resumo, para ELISA, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura overnight à 4°C. Após lavagem das placas com PBS-Tween e etapa de bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras teste 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 e conjugados com estreptavidina-peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagem, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H₂O₂ a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão.

4.8 Mensuração da expressão de moléculas co-estimulatórias e do complexo principal de histocompatibilidade em BMDMs

BMDMs de animais selvagens foram plaqueados em placas de cultura de 12 poços em triplicata (1×10^6 células/poço) e incubados a 37°C e 5 % CO₂. Após 24 horas de incubação, as células inibidas ou não com SB203580 (10µM) por 3 horas foram infectadas com taquizoitos vivos de *N. caninum* (MOI 1). Após, as 24 horas de infecção as células foram descoladas da placa e marcadas para citometria de fluxo com anticorpos conjugados a fluorocromos, seguindo protocolo previamente descrito (MINEO, et al., 2009).

Para a realização dos ensaios foram utilizados os seguintes anticorpos comerciais: CD11b-APC-Cy7, CD11c-V450, MHC I-FITC, MHCII-PE, CD80-APC e CD86-PE.Cy7 (BD Biosciences, San Diego, EUA). A fenotipagem dos BMDMs foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCantoII, BD) e os dados foram processados e analisados utilizando *software* apropriado (FlowJo, TreeStar, EUA).

4.9 Protocolo de imunização

Para os procedimentos experimentais, camundongos C57BL/6 selvagens foram distribuídos em quatro grupos de 10 animais, conforme as seguintes formulações: 1. PBS estéril, 2. SB203580 (10µM/animal); 3. NLA (50µg/animal), e SB203580+NLA.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos, identificados e imunizados por via intraperitoneal com três doses das formulações descritas acima, em um volume de 100 µL por animal, em intervalos de 15 dias. As concentrações dos antígenos e SB203580 foram determinadas com base em estudos anteriores (BROWN et al., 2008; O'SULLIVAN, WANG & REDMOND, 2009).

Os animais foram submetidos à sangria prévia (dia 0) e amostras de sangue foram coletadas aos 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização. Os soros obtidos após centrifugação (720 x g, 5 minutos) foram armazenados a -70°C até serem utilizados em testes sorológicos para análise de anticorpos. Três animais de cada grupo foram sacrificados e o baço coletado para cultura de esplenócitos.

4.10 Quantificação de IgG e subclasses específicos para *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 (50µL/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 biotinilados (Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA) anti-IgG1 de camundongo diluído 1:4000 em PBS-TM a 1% ou anti-IgG2a de camundongo diluído 1:2000 em PBS-TM a 1%. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas e incubadas (50 µL/poço) com estreptavidina-peroxidase (Sigma 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 a densidade óptica foi determinada a 405 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA).

4.11 Avaliação da proliferação de esplenócitos

As suspensões celulares obtidas do baço dos animais imunizados foram marcadas com 5 µM de *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFDA-SE). Após, 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as células foram lavadas duas vezes (350 x g, 5 minutos, 4°C) com meio RPMI 1640 suplementado. O sedimento final

foi ressuspensionado e realizou-se a contagem de células viáveis em câmara hemocitométrica, usando o corante de exclusão vital azul de Tripan a 0,4% em PBS. As suspensões celulares foram cultivadas, em quadruplicata, em placas de cultura de 96 poços (2×10^5 células/poço/200 μ L) e estimuladas com: o mitógeno concanavalina A (ConA, Sigma-Aldrich) a 2,5 μ g/mL; anticorpos anti-CD3e (145-2C11); ou NLA a 10 μ g/mL. Como controle, células não estimuladas foram adicionadas de meio de cultura somente. Após, 72 horas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C a proliferação celular foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD) e os dados foram processados e analisados utilizando *software* apropriado (FlowJo, TreeStar, EUA).

Os índices de proliferação celular foram calculados pela porcentagem de células que perderam fluorescência para o referido marcador, indicando divisão celular. Realizou-se um único ensaio em quadruplicata.

4.12 Desafio

Após 15 dias do último tratamento (45 dias da imunização inicial), os animais de todos os grupos foram desafiados com dose sub-letal de taquizoítos viáveis (1×10^7 parasitos/animal), em um volume de 100 μ L, pela via intraperitoneal. Após 30 dias do desafio, os animais foram eutanasiados e seus cérebros coletados e armazenados a -70°C para análise quantitativa de DNA genômico do parasito por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

4.13 PCR em tempo real

DNA genômico de *N. caninum* no cérebro de camundongos desafiados foi quantificado por PCR em tempo real (qPCR), através do sistema de detecção SYBR green, como anteriormente descrito (WAHAB et al., 2010; CARDOSO et al., 2011). Foram utilizados os seguintes pares de primers: Forward: 5'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-3'; Reverse: 5'-AGA GGA ATG CCA CAT AGA AGC- 3' (Prodimol Biotecnologia S.A., Belo Horizonte, MG), para detecção da região Nc5 de *N. caninum*. A extração de DNA foi realizada a partir de 20 mg de tecido cerebral utilizando o kit de purificação de DNA genômico (Wizard®, Promega Co., Madison, EUA), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de DNA

extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm) e ajustada para 200 ng/μL com água estéril e livre de DNase.

Os ensaios para quantificar a carga parasitária cerebral foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (StepOne Plus, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a contagem de parasitos foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraídos de 10^7 taquizoítos do isolado Nc-1 que foram incluídas em cada análise.

4.14 Análise estatística

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

4.15 Normas de biossegurança

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).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 *N. caninum* e seus antígenos induzem a fosforilação da MAPK/p38 em macrófagos murinos

Com a intenção de se determinar a fosforilação inicial de p38, JNK e ERK em BMDMs mediante a estimulação por *N. caninum*, utilizamos a dosagem pela técnica de CBA em lisados celulares na presença ou ausência de taquizoítos viáveis de *N. caninum* após 0, 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação. Observou-se a fosforilação de p38 de modo tempo-dependente, atingindo níveis máximos entre os 15 e 30 minutos após contato com os taquizoítos vivos, com tendência para diminuir a reatividade após os 60 minutos de estimulação. Dentro do mesmo período, não foi observado alterações significativas na fosforilação de ERK1/2 e JNK após a exposição aos parasitos vivos (Figura 2).

Estabelecendo-se 30 minutos como período ótimo de observação da fosforilação de p38, o próximo passo foi detectar a ativação das MAPKs em BMDMs expostos a diferentes frações antigênicas do protozoário (taquizoítos vivos de *N. caninum*, NLA, ESA) . Todos os antígenos testados foram capazes de induzir nestas células a ativação de p38 (Figura 3). Pode-se observar pelo resultados obtidos que os taquizoítos vivos induziram um aumento mais pronunciado da fosforilação de p38, se comparado com as células estimuladas com NLA ou ESA.

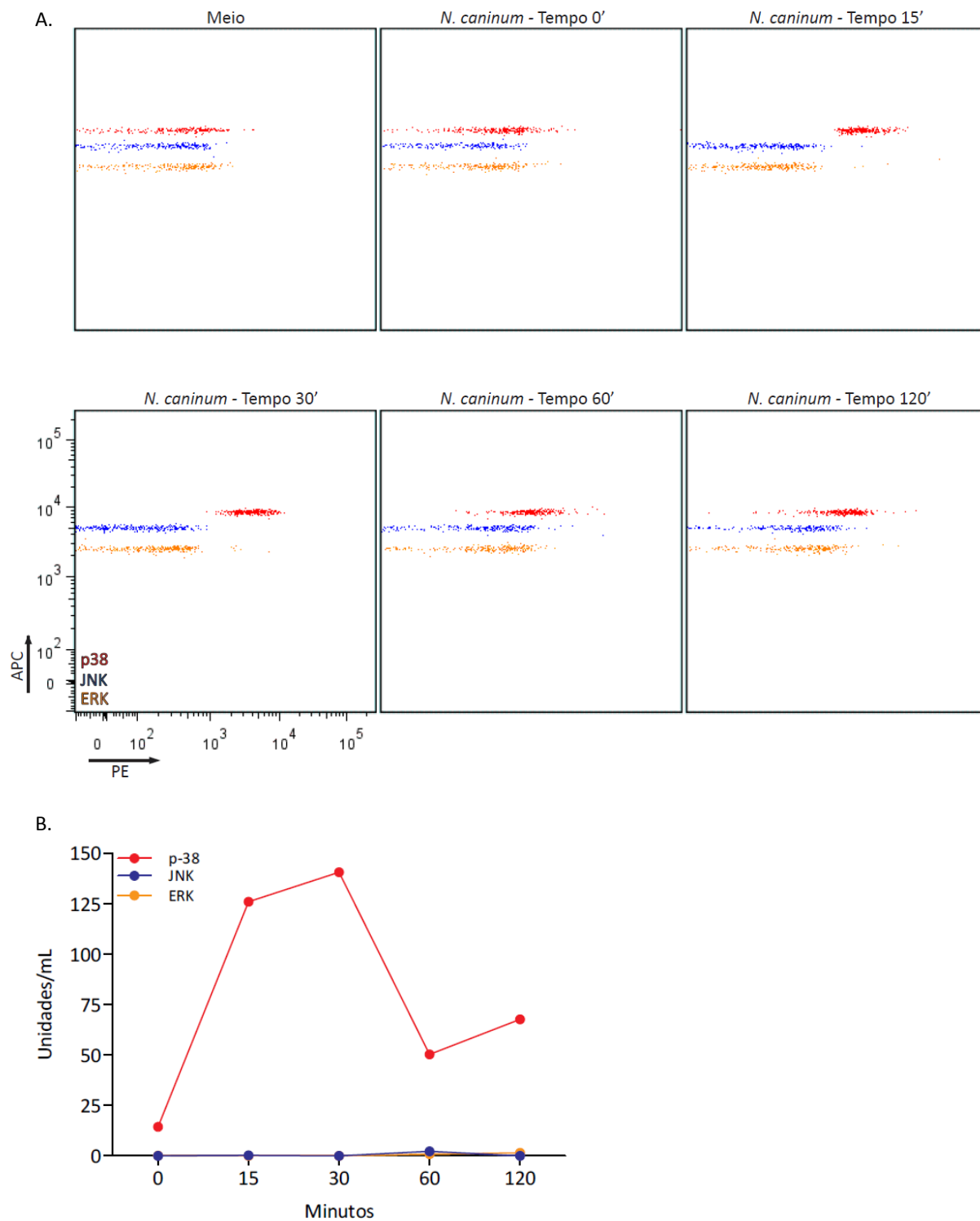


Figura 2. Detecção da fosforilação de p38, JNK e ERK em macrófagos murinos momentos iniciais da infecção por *Neospora caninum*. BMDMs foram cultivados na presença de taquizoítos vivos (MOI1), e após 0, 15, 30, 60 e 120 minutos de infecção as células foram lisadas para análise por CBA. Os resultados foram representados em dot plots representativos (A) e gráfico com os resultados compilados (B). Os resultados demonstrados são representativos de um único experimento independente em triplicata.

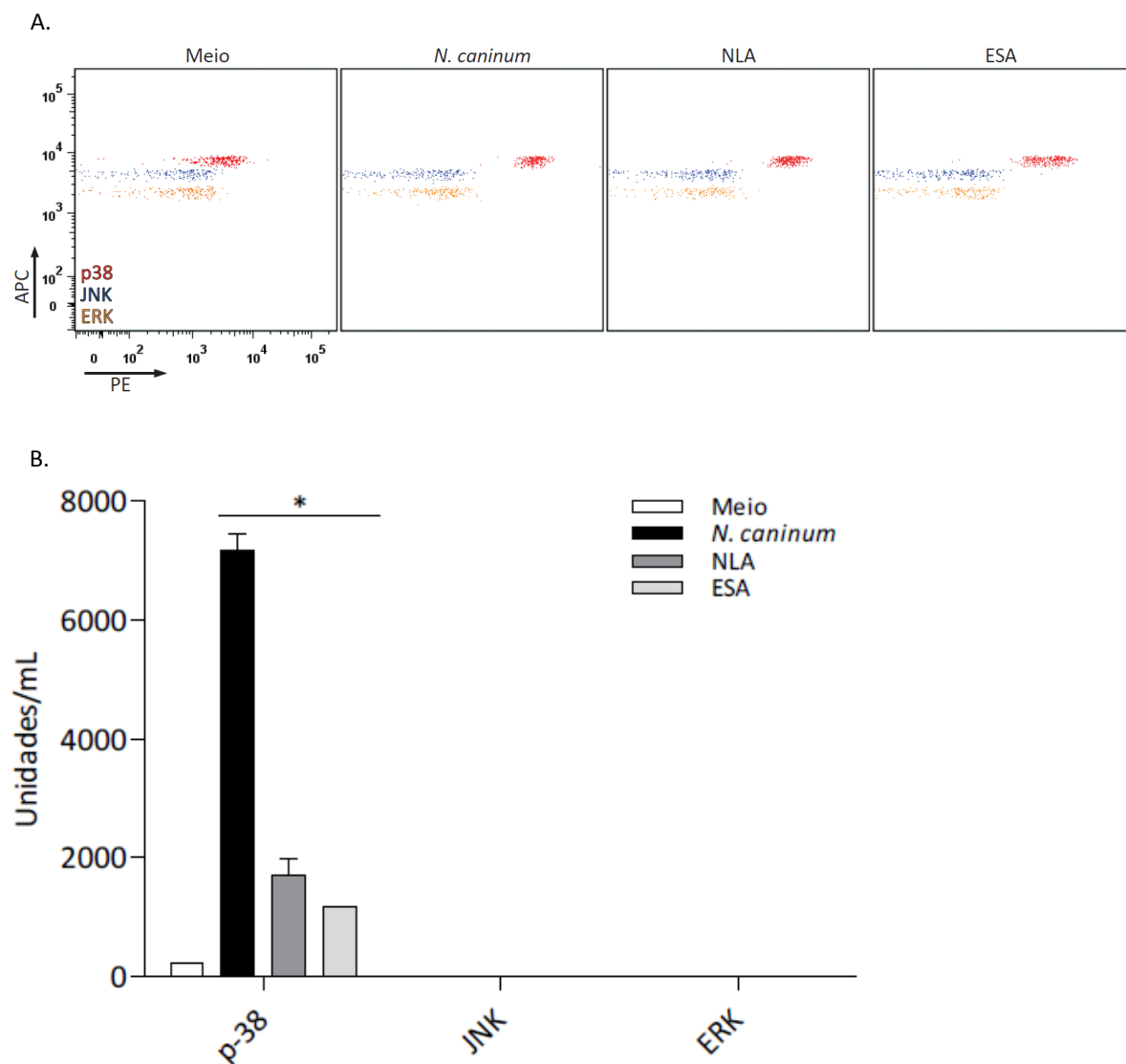


Figura 3. Detecção da fosforilação de p38, JNK e ERK em macrófagos murinos infectados/infectados por *N. caninum* ou estimulados com NLA ou ESA. BMDMs foram cultivados em placa de cultura por 30 minutos juntamente com taquizoítos vivos de *N. caninum* (MOI1), NLA ou ESA. Após o período de incubação, as células foram lisadas para análise por CBA. Os dados foram representados em gráficos de dot plot (A) e barra (B). Os valores são indicados como média $\pm$ desvio padrão da média. * indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Os resultados demonstrados são representativos de um único experimento independente em triplicata.

5.2 Baixa citotoxicidade dos inibidores de MAPKs em BMDMs

Com a intenção de se otimizar a dose dos diferentes inibidores farmacológicos utilizados, a viabilidade celular foi determinada para diferentes concentrações dos inibidores SB203580, SP600125 e PD98059 (Figura 4), por meio de diluições duplas seriadas variando entre 40 e 1,25 μ M. Foram observadas taxas de 112 % e 84 % de viabilidade celular nas concentrações mais altas do inibidor SB203580 após 3 horas (Fig. 4A) e 24 horas (Fig. 4B) de tratamento com o inibidor, respectivamente. Para SP600125 foi observado taxas de 121% e 68% de células viáveis após 3 e 24 horas de tratamento (Figura 4C e D) e para PD98059 90% e 82% (Figura 4E e 4F), respectivamente.

Não foi possível calcular a dose citotóxica mediana (dose tóxica para 50% da células – DT_{50}) para os diferentes inibidores, uma vez que todos os inibidores apresentaram viabilidade celular maior que 70%, mesmo quando as concentrações mais elevadas de todos os fármacos (40 μ M) foram testadas. Neste cenário, determinou-se a dose de uso de 10 μ M para todos os experimentos, por apresentar os menores efeitos citotóxicos, aliado a maior concentração da base farmacológica.

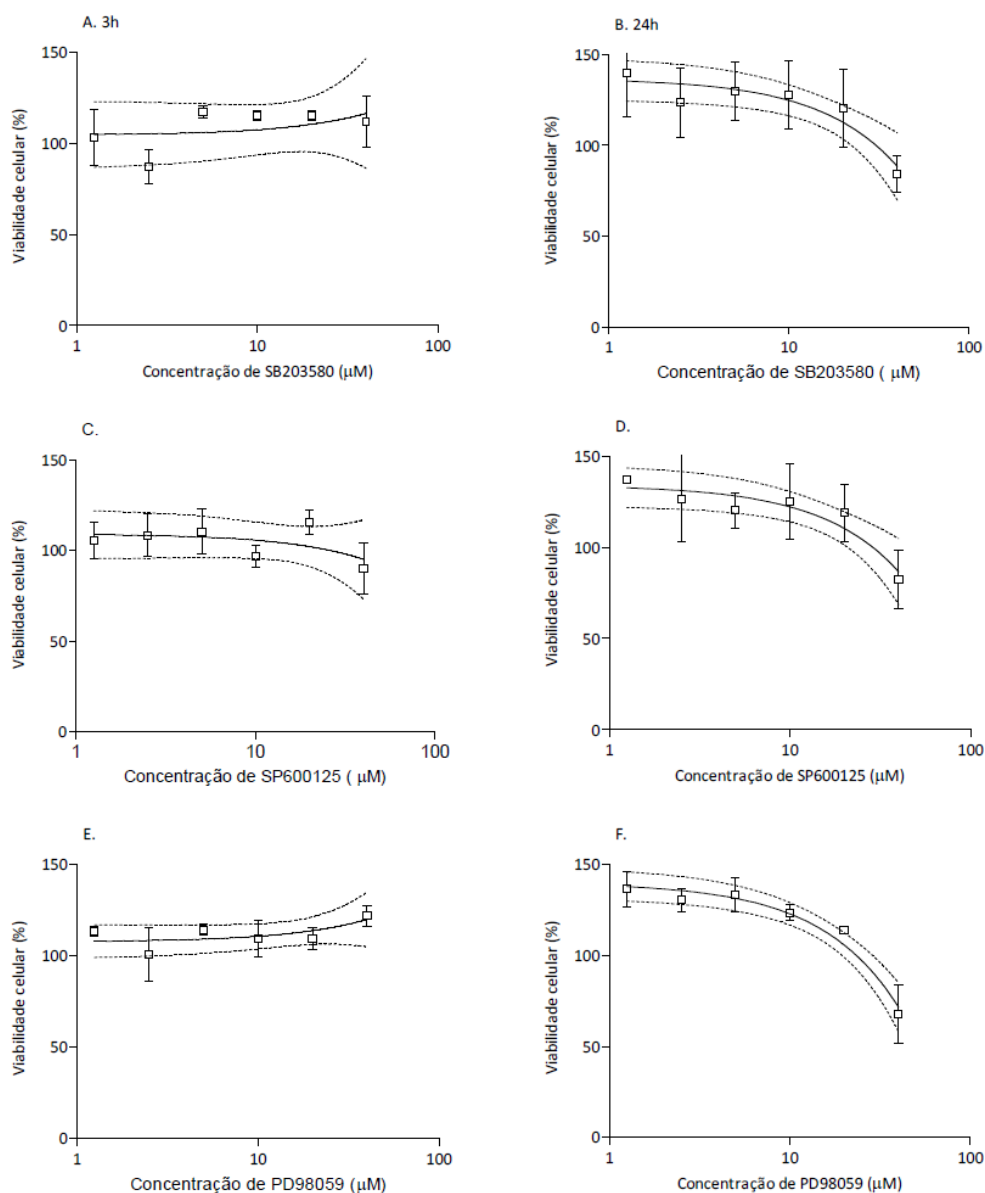


Figura 4. Determinação da atividade citotóxica dos inibidores farmacológicos utilizados por MTT. BMDMs foram cultivados na presença de diferentes concentrações dos inibidores SB203580 (A e B) ou SP600125 (C e D) ou PD98059 (E e F) em diferentes tempos de tratamento (3 e 24 horas). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle. Os resultados demonstrados são representativos de dois experimentos independentes em quadruplicata.

5.3 *N. caninum* ativa MAPK/p38 e modula a produção das citocinas IL-12 p40 e IL-10, e a expressão de moléculas co-estimulatórias, mas não altera a expressão do complexo principal de histocompatibilidade em BMDMs

A fim de se verificar o papel fenotípico das diferentes MAPk nas funções relativa a apresentação antigênica exercida por macrófagos durante a infecção por *N. caninum*, BMDMs foram tratados com inibidores específicos para p38 (SB203580), JNK (SP600125) ou ERK 1/2 (PD98059). Primeiramente, foi verificada a função das MAPKs na indução das citocinas IL-12p40 e IL-10, sendo que a inibição de p38 proporcionou um aumento significativo na produção de IL-12p40 aliada a diminuição de IL-10 após 24 horas de exposição ao parasito vivo (Figura 5A e B). A inibição de ERK 1/2 e JNK não produziu diferenças notáveis em relação a BMDMs infectados e não tratados, com exceção feita a diminuição dos níveis de IL-10 mediante o bloqueio de JNK. De forma concordante, as células tratadas com SB203580 e infectado por *N. caninum* apresentaram razão IL-12 p40/IL-10 maior que os demais grupos experimentais, enquanto que o bloqueio das MAPKs com os demais inibidores específicos não induziu diferença significativa em relação ao grupo controle.

Aliado ao perfil de citocinas produzido, foram analisados a expressão das moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86) e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em BMDMs mediante a infecção por *N. caninum*. Foi observado que a infecção reduz a expressão de CD80 e CD86 se comparado a BMDMs *naïve*. De forma coincidente ao observado em relação perfil de citocinas produzido, o pré-tratamento de BMDMs com SB203580 induziu um aumento considerável na expressão de CD80 e CD86 nas células infectadas, sendo que praticamente 100% das células submetidas a esta condição expressaram esta classe de moléculas co-estimulatórias (Figura 6A).

A infecção por *N. caninum* também alterou a expressão de moléculas de MHC em BMDMs. A expressão de MHCII foi aumentada após a exposição dos macrófagos aos taquizoitos vivos de *N. caninum*, e a inibição da via p38 induziu um ligeiro aumento na porcentagem de células MHCII positivas. Por outro lado, a infecção de BMDMs limitou significativamente a expressão de MHCI, sendo que mais de 50% dos BMDMs infectados apresentaram-se como MHCI-, enquanto que o grupo não infectado apresentou mais de 90% das células expressando MHCI (Figura 6B).

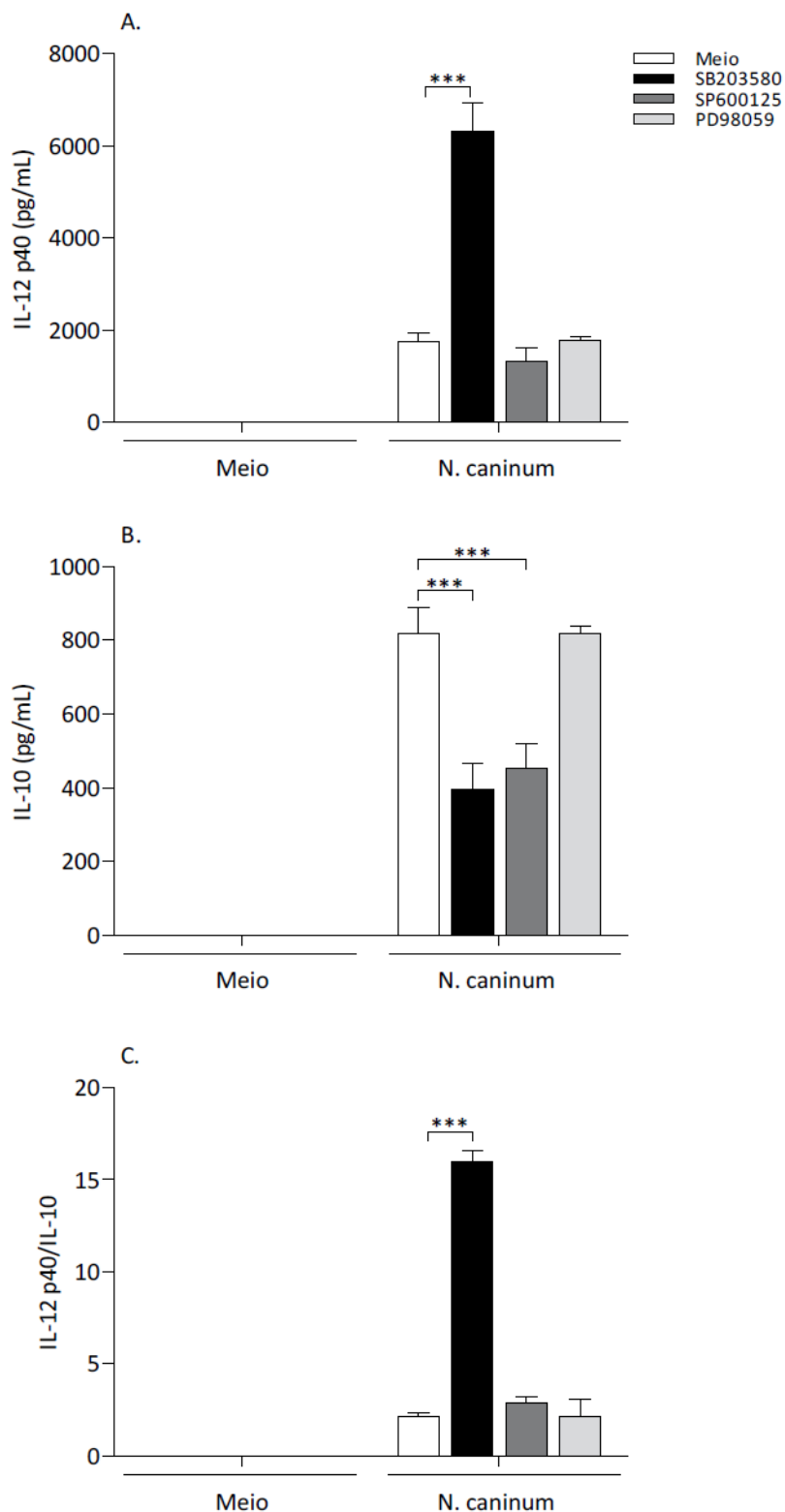


Figura 5. Produção de IL-12p40 (A) e IL-10 (B) por BMDMs tratados com 10 μ M de SB203580, SP600125 ou PD98059 e infectados por taquizoítos vivos de *N. caninum* (MOI1). A razão entre IL-12p40/IL-10 também é demonstrada (C) Sobrenadantes de cultura foram coletados e analisados após 24 horas de infecção. Dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. *indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Os resultados demonstrados são representativos de 3 experimentos independentes em quadruplicata.

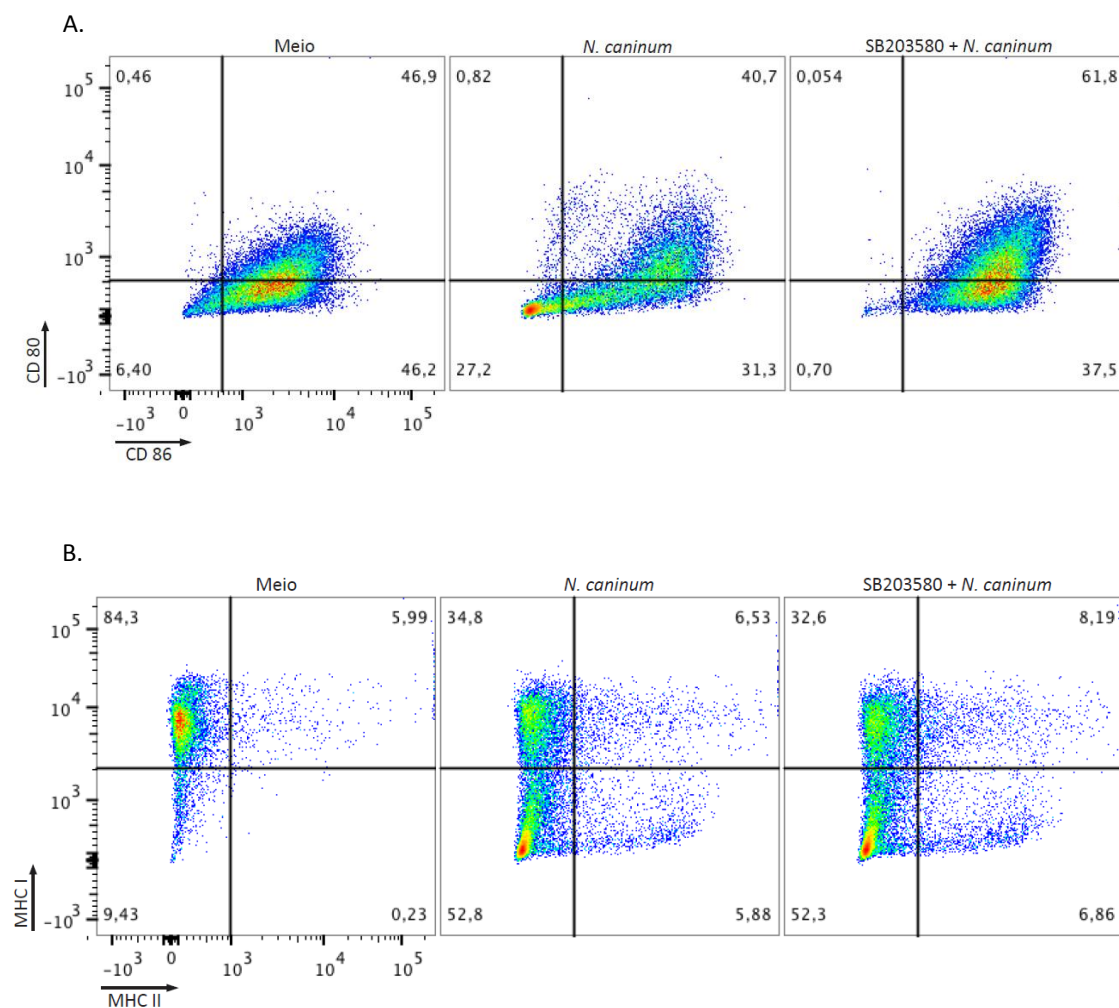


Figura 6. Caracterização da expressão de moléculas co-estimatórias (A) e do complexo principal de histocompatibilidade (B) em BMDMs infectados por taquizoítos vivos de *N. caninum* (MOI1), na ausência ou presença de SB203580. Após 24 horas de infecção as células foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em gráficos representativos de três experimentos independentes em triplicata.

5.4 *N. caninum* ativa MyD88 e PI3K, e modula a produção das citocinas IL-12 p40 e IL-10 em BMDMs

A fim de definir os mecanismos que induzem os efeitos reguladores sobre a produção de citocinas, foram testadas duas vias de sinalização conhecidas por serem capazes de induzir a fosforilação de p38: TLRs e AKT/mTOR, através de suas principais proteínas adaptadoras, MyD88 e PI3K, respectivamente. Em concordância com resultados prévios que demonstraram que a produção de IL-12p40 é dependente do reconhecimento por TLRs, os resultados aqui obtidos demonstraram que a produção de IL-12p40 e IL-10 após exposição aos parasitos vivos foi completamente abolida na ausência de MyD88 (Figura 7A e 7B).

Por outro lado, a inibição da PI3K pelo inibidor Wortmannin induziu um aumento na produção de IL-12p40 (Figura 8A) e diminuição de IL-10 (Figura 8B) em BMDMs infectados pelo protozoário, quando comparado com o grupo não-tratado e infectado, semelhante ao perfil de produção de citocinas que ocorre nas células inibidas por SB203580. A inibição dupla por SB203580 e Wortmannin de células infectadas não foram diferentes daqueles submetidos a um único inibidor. O grupo pré-tratado com SB203580 ou Wortmannin ou duplo inibido (SB203580 e Wortmannin) e infectado por *N. caninum* apresentaram razão IL-12p40/IL-10 maior que o grupo infectado (controle), sendo que não houve diferença estatística entre eles (Figura 8C).

Quando analisado a produção dessas citocinas entre BMDMs de animais WT e PI3K^{-/-} infectados por taquizoítos vivos de *N. caninum*, observa-se maior produção de IL-12p40 (Figura 9A) e menor de IL-10 (Figura 9B) no grupo knockout para PI3k em relação ao grupo selvagem. Este mesmo perfil na regulação positiva de IL-12 p40 é visto nas células do WT e PI3K^{-/-} inibidos com SB203580 ou Wortmannin e infectadas. Em relação a produção de IL-10, quando o grupo PI3K^{-/-} foi inibido com SB203580 ou Wortmannin e infectado com taquizoítos vivos há uma menor produção de IL-10 comparado com os BMDMs de PI3K^{-/-} sem tratamento e infectados.

O grupo WT e PI3K^{-/-} pré-tratado com SB203580 ou Wortmannin e infectado por *N. caninum* apresentaram razão IL-12p40/IL-10 maior que o grupo infectado (controle), sendo que não houve diferença estatística entre eles. E os BMDMs dos animais PI3K^{-/-} não-tratados com SB203580 ou Wortmannin e infectados apresentaram maior razão IL-12p40/IL-10 em relação a BMDMs WT (Figura 9C).

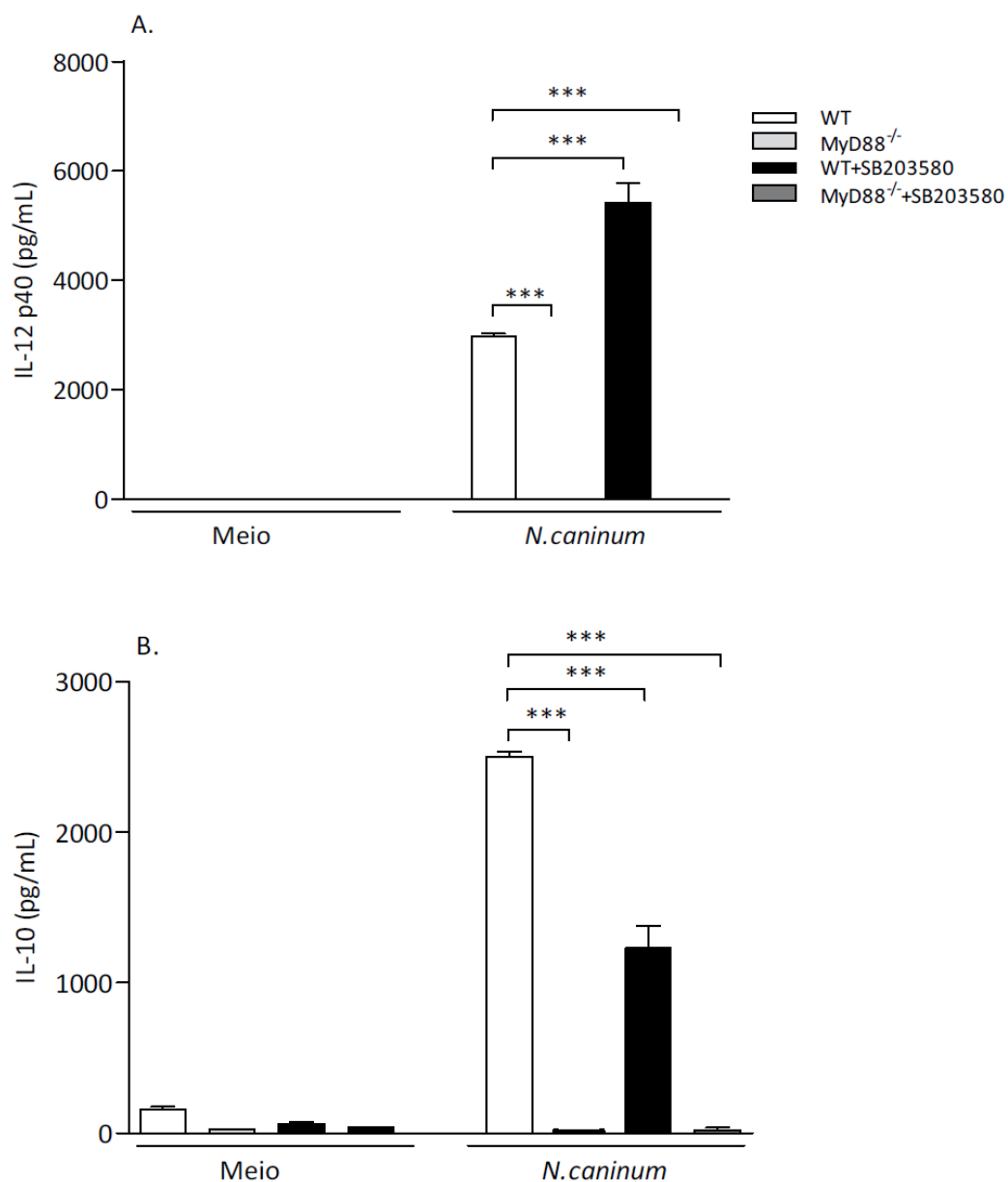


Figura 7. Produção de IL-12p40 (A) e IL-10 (B) por BMDMs advindos de camundongos selvagens e geneticamente deficientes para MyD88, tratados com o inibidor SB203580 e infectados por taquizoítos vivos de *N. caninum* (MOI1). Sobrenadantes de cultura foram coletados e analisados após 24 horas de infecção. Dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. *indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Os resultados demonstrados são representativos de 2 experimentos independentes em quadruplicata.

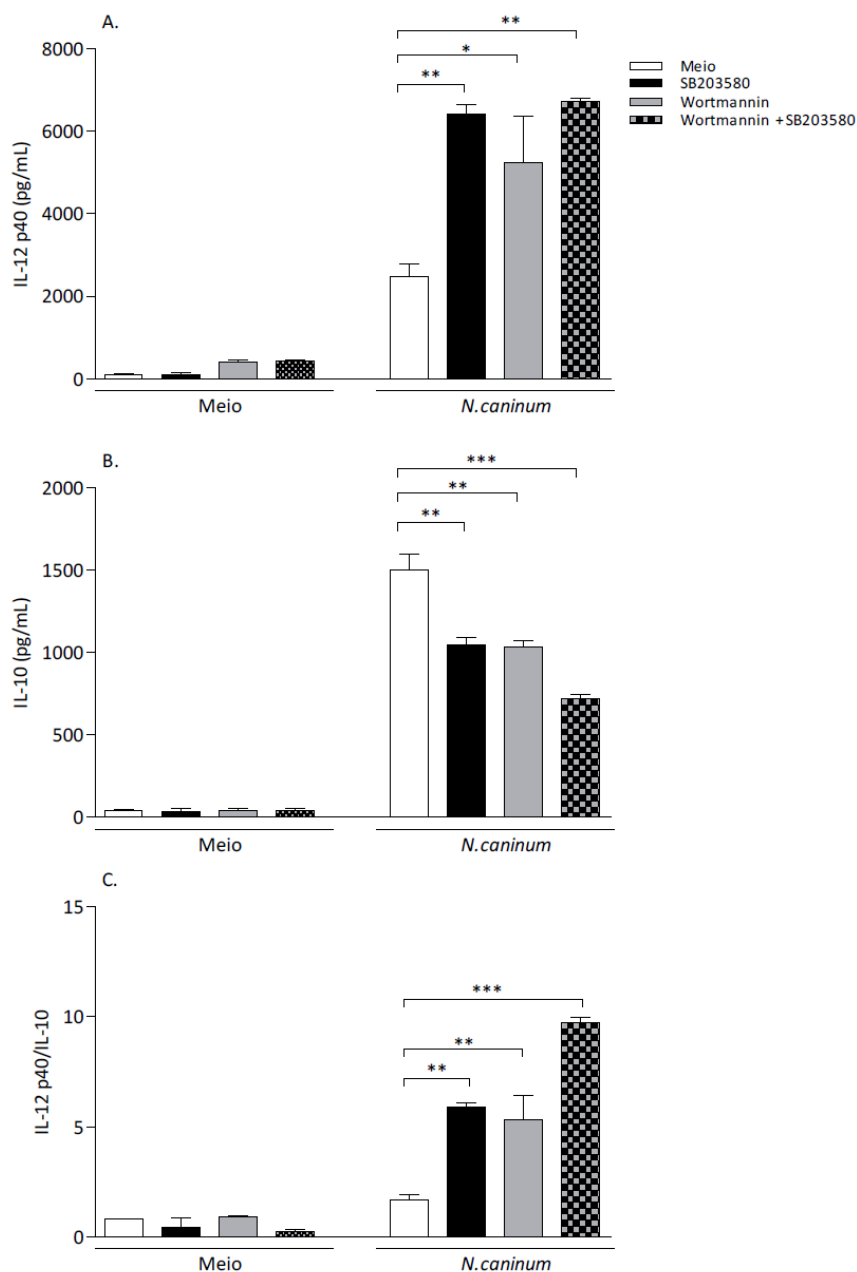


Figura 8. Produção de IL-12p40 (A) e IL-10 (B) por BMDMs tratados com os inibidores SB203580 ou Wortmannin e infectados por taquizoítos vivos de *N. caninum* (MOI1). A razão entre IL-12p40/IL-10 também é demonstrada (C). Sobrenadantes de cultura foram coletados e analisados após 24 horas de infecção. Dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. *indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Os resultados demonstrados são representativos de 2 experimentos independentes em quadruplicata.

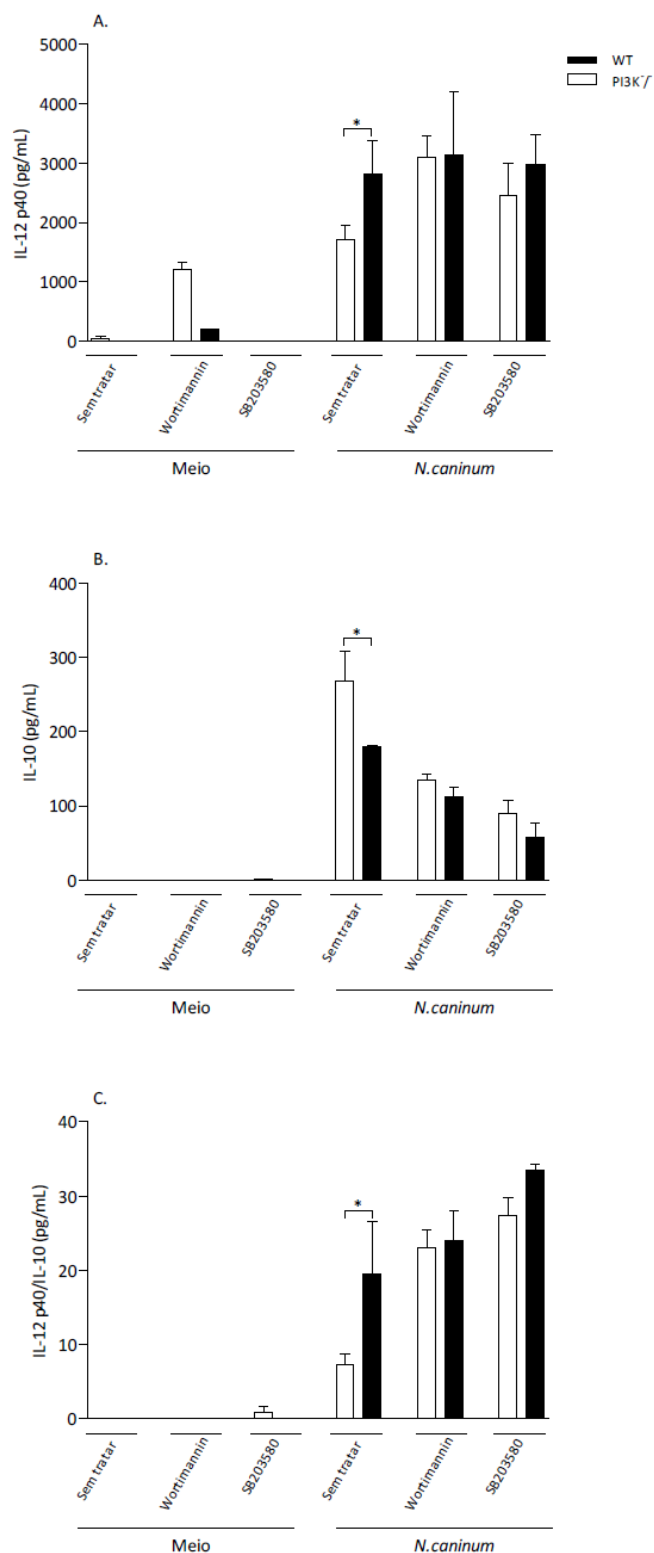


Figura 9. Produção de IL-12p40 (A) e IL-10 (B) por BMDMs advindos de camundongos selvagens (WT) e geneticamente deficientes de PI3K, tratados com os inibidores SB203580 ou Wortmannin e infectados por taquizoítos vivos de *N. caninum* (MOI1). A razão entre IL-12p40/IL-10 também é demonstrada (C). Sobrenadantes de cultura foram coletados e analisados após 24 horas de infecção. Dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. *indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Os resultados demonstrados são representativos de 3 experimentos independentes em quadruplicata.

5.5 Imunização de camundongos utilizando o inibidor farmacológico específico para p38 melhora a resposta imune adaptativa celular contra o desafio por *N. caninum*

Devido aos resultados compilados nos experimentos *in vitro*, onde observamos que a ativação de p38 resulta em uma inibição das funções de célula apresentadora de antígenos dos macrófagos mediante a infecção por *N. caninum*, realizamos experimentos baseados em protocolos vacinais utilizando o inibidor específico da via regulatória como adjuvante.

Num primeiro momento, a resposta imune celular foi analisada a partir da proliferação *ex vivo* de esplenócitos marcados com CFDA-SE após estimulação mitogênica e antigênica (Figuras 10). A proliferação das células do baço estimuladas com o mitógeno ConA ou anti-CD3 foi evidenciada por elevada proliferação em relação aos grupos estimulados com NLA ou meio. No entanto, as células proliferaram de forma mais acentuada quando estimuladas com ConA, principalmente nos animais imunizados com SB203580 e NLA+SB203580, se comparado com o grupo PBS e NLA. A estimulação com antígenos solúveis do parasito induziram baixo poder proliferativo em todos os grupos, sendo que estes não apresentaram diferenças significativas entre si.

Adicionalmente, foi acessado a cinética da resposta imune humoral de anticorpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* em soros dos camundongos imunizados (Figura 11). Camundongos imunizados com NLA ou NLA+SB203580 apresentaram níveis significativamente maiores de IgG total anti-*N. caninum* do 15° ao 45° dia pós-imunização (d.p.i.) em comparação com os animais imunizados apenas com SB203580 e PBS (controles) (Figura 11A), contudo não apresentaram diferenças significativas entre si. Em concordância, a cinética da sub-classe IgG1 anti-*N. caninum* (Figura 11B), os grupos NLA e NLA+SB203580 demonstraram maiores níveis de IgG1 do 15° ao 45° d.p.i. em comparação com os grupos imunizados apenas com SB203580 e PBS ($p < 0,05$). E no 30° d.p.i. os animais imunizados com NLA+SB203580 apresentaram níveis maiores de IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* em relação ao grupo NLA (Figura 11B). A cinética do isotipo IgG2a anti-*N. caninum* (Figura 11C) apresentou um padrão similar daquela observada para o isotipo IgG1.

Após o protocolo de imunização, os animais foram desafiados com 1×10^7 taquizoítos vivos do isolado Nc-1 de *N. caninum*, sendo a carga parasitária cerebral determinada por qPCR após 30 dias de infecção. Os camundongos imunizados com SB203580 demonstraram menor carga parasitária cerebral em relação ao grupo PBS ($p < 0,05$) (Figura 12). Para NLA e NLA+SB203580 observou-se que não houve diferença significativa em relação ao grupo PBS.

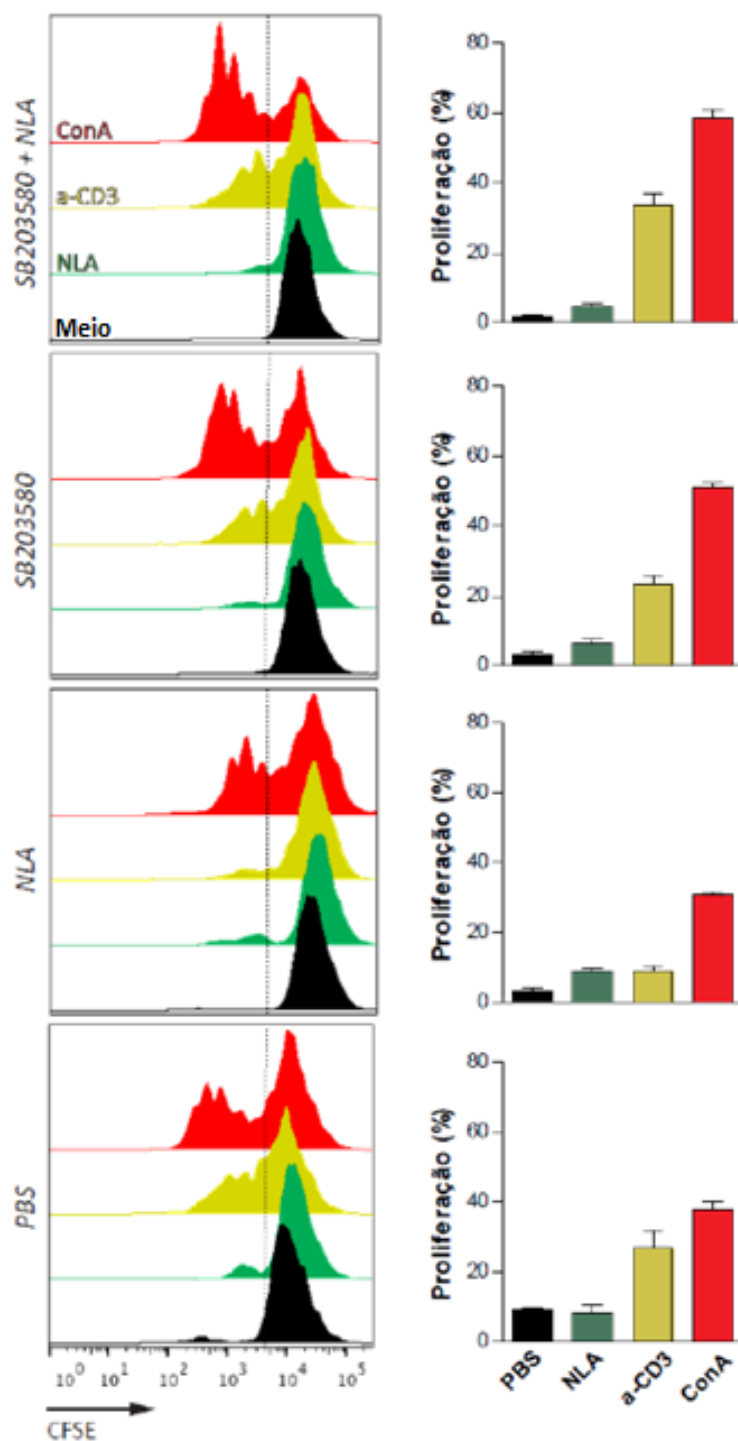


Figura 10. Ensaio de proliferação celular por CFDA-SE. Esplenócitos provenientes de camundongos C57BL/6 naïve ou imunizados com NLA, SB203580, ou NLA+SB203580 foram utilizados para o experimento. Após 72 horas de estimulação mitogênica (ConA ou anti-CD3) ou antigênica (NLA), a fluorescência remanescente foi determinada em citômetro de fluxo. Foi realizado um único ensaio em quadruplicata. Valores de proliferação celular são indicados como média $\pm$ desvio padrão da média.

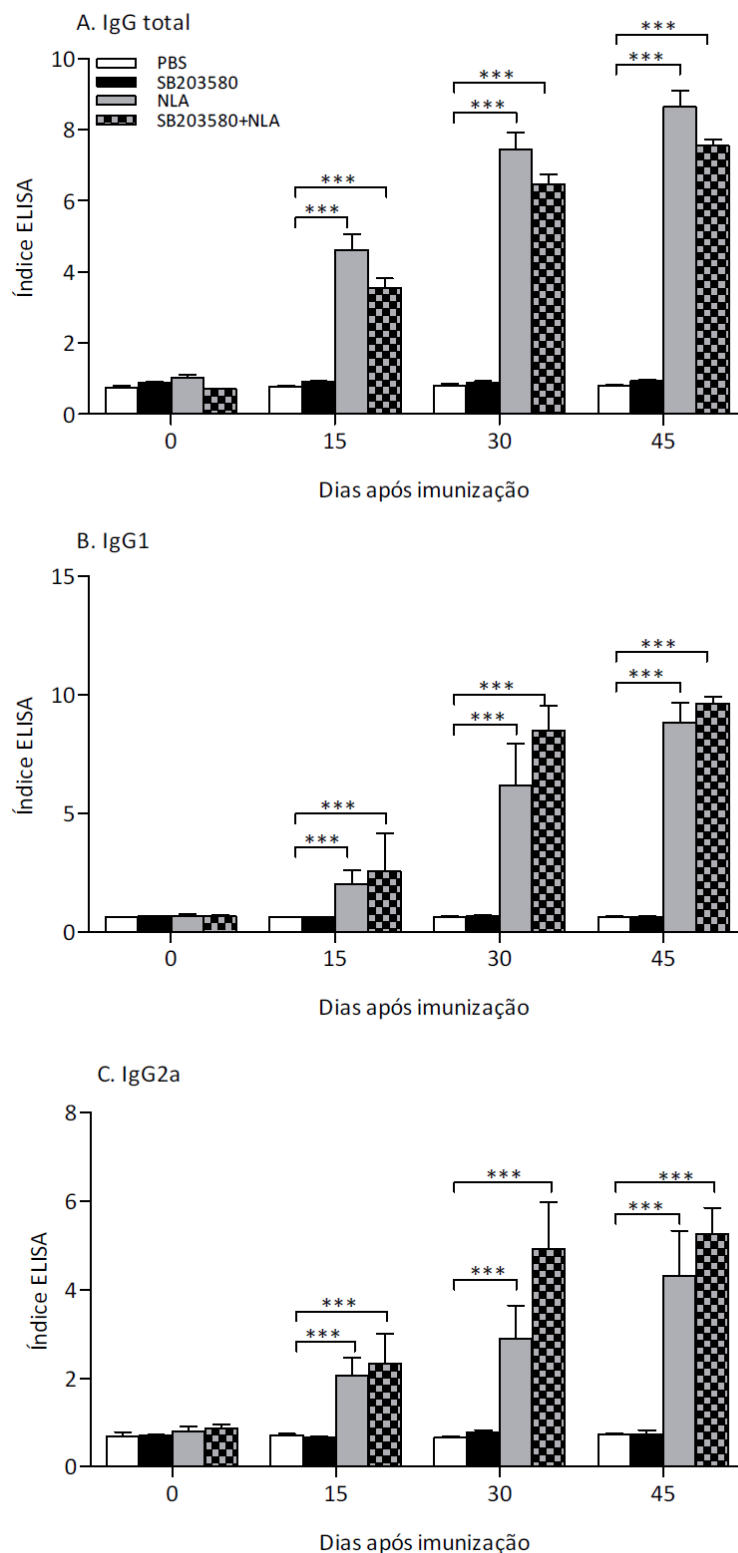


Figura 11. Níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) anti-*N. caninum*, determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 imunizados com NLA associado ou não com o inibidor SB203580 e respectivos controles. Amostras de sangue foram coletadas aos 0, 15, 30 e 45 dias após imunização. Valores de índice ELISA são indicados como média $\pm$ erro padrão da média. * indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Os resultados demonstrados são representativos de um único experimentos em quadruplicata.

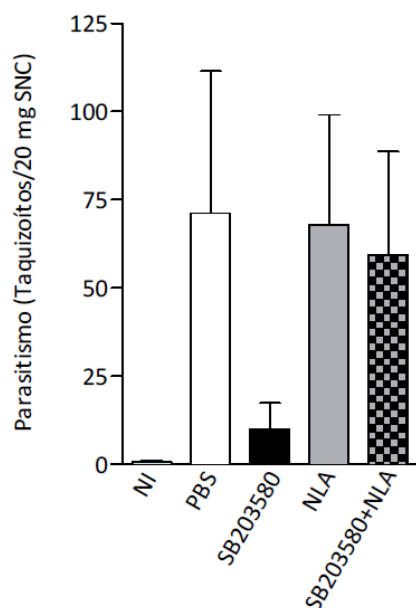


Figura 12. Carga parasitária cerebral, determinada por PCR em tempo real quantitativo, em cérebros de camundongos imunizados com antígenos solúveis (NLA) associado ou não com SB203580 e respectivos controles (não infectado e PBS) e desafiados com 1×10^7 taquizoítos do isolado Nc-1 de *N. caninum* após 30 dias de infecção. Dados são expressos como média $\pm$ erro padrão ($p < 0,05$ ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni). Os resultados demonstrados são representativos de um único experimento septuplicata.

6 DISCUSSÃO

N. caninum é o causador da neosporose, e é reconhecido como importante causa de doenças neuromusculares em cães e aborto em bovinos em todo o mundo. Portanto, esses abortos provocam um sério impacto econômico nas indústrias de corte e de leite (LARSON et al., 2004; REICHEL & ELLIS, 2009). A perda econômica na maioria das fazendas é estimada em 2-5% ao ano, mas pode chegar a 20% por ano em algumas propriedades rurais (GOODSWEN, KENNEDY, ELLIS, 2013).

Para controlar de forma eficaz a neosporose, é essencial que haja uma melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro. Com esse objetivo, o presente trabalho buscou avaliar o papel das MAPKs na modulação da resposta imune inata pelo *N. caninum*. Sabe-se que a interação de diversos parasitos intracelulares, como *T. gondii* e *Leishmania* spp, com macrófagos pode resultar na modulação das vias de sinalização intracelulares, como mecanismos de evasão, a fim de se perpetuar a sobrevivência destes patógenos no hospedeiro (BASU et al., 2006).

As MAPKs desempenham um papel central na transdução de sinal e regulam diversos processos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células em todos os eucariotos. Assim, a cascata de sinalização por MAPK é importante na indução da resposta imune inata e adaptativa (BRULINK et al., 2011b; LAWSON et al., 2013).

O presente estudo avaliou a ativação das MAPKs em BMDMs infectados por *N. caninum* em diferentes intervalos de tempo e observou-se que apenas p38 foi ativada durante a infecção, com maior pico de fosforilação após 30 minutos. Este resultado corrobora com o de diversos estudos já realizados, que demonstraram que o pico do sinal das MAPKs ocorre entre 15 e 30 minutos após a estimulação dos macrófagos com lipolissacarídeos (LPS), antígeno de *Trypanosoma* sp. (ROPERT et al., 2001), *T. gondii* (KIM et al., 2005) e antígenos de helmintos (KLOTZ et al., 2011).

Ao se determinar o tempo de ativação das MAPKs e visto que o parasito vivo ativa somente p38 nas condições testadas, foi analisado quais frações antigênicas de *N. caninum* induziriam o mesmo perfil de ativação que os taquizoítos vivos. Foi observado que os antígenos do parasito (NLA e ESA) também são capazes de induzir a ativação de p38. Desta forma, podemos inferir que a indução de p38 ocorre por antígenos secretados-excretados. A busca pelos alvos antigênicos com tal potencial de ativação faz-se necessária e agora devem ser melhor investigados.

Estudos prévios têm correlacionado a ativação das MAPKs, principalmente a via p38, com a produção de citocinas, inflamação, apoptose, crescimento e diferenciação celular. Estes estudos demonstram que a inibição da ativação de p38 em APCs induz preferencialmente respostas do tipo Th1 (YANG et al., 2010; KLOTZ et al., 2011). Esse fenômeno foi observado em macrófagos incubados com PAMPs de helmintos que ativam ERK e p38 para induzir IL-10 e regular negativamente a produção de IL-12p40 (KLOTZ et al., 2011). YANG e colaboradores (2010) ao estimular macrófagos e células dendríticas com LPS, flagelina, lipoproteína A, CpG e *L. major* observaram o mesmo perfil na produção de IL-12, pois estes PAMPs ativam a cascata de sinalização via p38 e são capazes de modular a resposta imune inata a seu favor. Após inibição da via, os autores observaram um aumento de IL-12p40 semelhante ao relatado neste trabalho (YANG et al., 2010). De forma concordante, SALMON e colaboradores (2001) também observaram aumento da produção de IL-12 por macrófagos de exsudato peritoneal estimulados com LPS mediante bloqueio farmacológico de p38.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a idéia de que a inibição da ativação das MAPKs pode exercer um efeito na produção de citocinas em BMDMs. Especificamente, mostra-se que a inibição de p38 pode resultar no aumento dos níveis de IL-12p40 e diminuição da IL-10 em macrófagos infectados por *N. caninum*. No entanto, o papel da via de sinalização de p38 na produção de IL-12 é ainda controverso. Enquanto alguns grupos de pesquisa defendem que a inibição de p38 contribui para o aumento dos níveis de IL-12 em células inatas estimuladas por diversos antígenos, outros demonstram que a deleção dessa via tem feito negativo na produção de IL-12 (KIM et al., 2005, 2008; KANG et al., 2008). Porém, deve-se considerar o modelo experimental de cada estudo, ou seja, o tipo celular, os antígenos e o tempo de infecção observados.

De acordo com a literatura e os resultados obtidos no presente trabalho, a inibição da via p38 não altera somente síntese de citocinas frente a infecção, mas também aumenta a expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86 em células apresentadoras de antígeno (RINCÓN et al., 1998; YU et al., 2003; BERENSON et al., 2006). Em concordância com os modelos citados, observamos que macrófagos infectados por *N. caninum* apresentam uma diminuição na expressão de CD80 e CD86, e mediante bloqueio da via de p38, há uma regulação positiva na expressão das moléculas co-estimulatórias, principalmente CD80. Contudo, a via em estudo não está relacionada a diminuição da expressão de MHC I e II por taquizoítos,

uma vez que não houve alteração significativa na expressão das diferentes classes de MHC após ensaios com inibição química. Seguindo tais dados, o bloqueio da fosforilação de p38 pode contribuir com a melhor ativação e direcionamento da resposta adaptativa na tentativa de eliminar e controlar a infecção.

Neste contexto, os inibidores de p38 tem demonstrado ter atividade anti-parasitária contra os parasitos do filo Apicomplexan tanto *in vitro* como *in vivo* (HAMMAKER & FIRESTEIN, 2010; BRUMLIK, et al., 2011a). Estudos recentes mostraram que diversos inibidores de p38 (SB203580 e SB202190) podem ser úteis no tratamento de infecções por *T. gondii*, *E. cuniculi* e *P. falciparum*, uma vez que diminuem a replicação do parasito e se mostram atóxicos para células de mamíferos *in vitro* (WEI et al., 2002, 2007; BRUMLIK et al., 2011b), e bem tolerados quando administrados em camundongos (WEI et al., 2007). O envolvimento das MAPKs na invasão e replicação dos taquizoítos de *T. gondii* foi também apresentado por KIM e colaboradores (2006), no qual a infecção de células HeLa por *T. gondii* resultou em um aumento da fosforilação das MAPKs, e ao se tratar com os inibidores SB203580 e/ou SP600125, houve inibição na replicação dos taquizoítos.

Dessa forma, ao se imunizar camundongos C57BL/6 com NLA na presença do inibidor SB203580, observou-se que as células dos animais imunizados com o inibidor proliferam mais em relação ao grupo NLA e PBS, quando estimulados com mitógenos, mostrando uma maior potencialidade de resposta se comparado aos animais imunizados somente com antígenos parasitários. No entanto, deve-se considerar que os antígenos deste protozoário suprimem vigorosamente a ativação e proliferação de linfócitos T. Assim, quando os camundongos foram desafiados com *N. caninum*, observou-se uma menor carga parasitária do grupo imunizado somente com SB203580 em relação aos grupos PBS, NLA e NLA+SB203580, mostrando um efeito protetor do inibidor de p38 e supressor do NLA. Portanto, a utilização de inibidores p38 para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas contra agentes patogênicos intracelulares, aumentando a ativação das células T e direcionando para um perfil Th1 (NAKAHARA et al., 2006; BASU et al., 2006; YANG et al., 2010; KLOTZ et al., 2011).

Com a intenção de desvendarmos os mecanismos moleculares responsáveis pela ativação da via em análise, verificamos o papel das proteínas adaptadoras MyD88 e PI3K no contexto abordado. Os resultados obtidos indicam que a ativação de p38 por *N. caninum* é dependente de PI3K, devido ao perfil de citocinas semelhantes, no qual há

um aumento na produção de IL-12p40 e diminuição de IL-10 em macrófagos de animal knockout para PI3K ou selvagem após o tratamento com os inibidores de PI3k e p38 e infectados pelo parasito vivo. Estes achados estão de acordo com LIU et al. (2007), que demonstraram que os macrófagos tratados com Wortmannin - inibidor farmacológico de PI3K - e estimulados com LPS regulam positivamente a produção de IL-12. Adicionalmente, o tratamento com SB203580 e Wortmannin em macrófagos derivados de animais geneticamente deficientes para PI3K não resulta em efeito aditivo considerável na produção de IL-12 após a infecção por taquizoítos vivos de *N. caninum*.

Contudo, é necessário levar em consideração que Wortmannin bloqueia todas as isoformas de PI3K, enquanto que os animais utilizados neste estudo apresentam depleção gênica somente para isoforma p110 α . As isoformas de PI3K são divididas em três classes (classe I, classe II e classe III) com base em características estruturais. As proteínas da família PI3Ks classe I, as mais abordadas experimentalmente, são representadas pelas isoformas p110 α , p110 β , p110 γ e p110 δ , embora ainda haja muito a ser aprendido sobre sua cascata de sinalização. A Classe II é representado pela PI3K-C2 α , PI3K-C2 β e PI3K-C2 γ , que permanecem enigmáticas, com papéis na transdução de sinal mal definidos. E a classe III é representada pela VPS34, também conhecido como PIK3C3 e a sua importância fisiológica não é clara. Nos mamíferos, PI3Ks de classe I estão presentes em todos os tipos de células, com p110 δ e p110 γ sendo altamente enriquecido em leucócitos (VANHAESEBROECK et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que as isoformas de classe I desempenham papéis distintos na sinalização celular (UTERMARK et al., 2012). Estudos prévios, também mostram o envolvimento transdução de sinal via PI3k/AKT e MAPK na regulação da resposta imune inata contra *L. stagnalis*, na função de fagocitose e motilidade celular (ZELCK, GEGER & SCHMID, 2007) e na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados com antígeno de *L. donovani* (BASU et al., 2006), e na regulação negativa na produção de IL-12 por *L. amazonensis* em BMDMs (RUHLAND & KIMA, 2009). Adicionalmente foi demonstrado que a cepa RH de *T. gondii* modula a produção de IL-12 em macrófagos via ativação de p38 independente de MyD88, enquanto a cepa ME-49 regula a citocina via ERK1/2 e p38 dependente de MyD88. Além disso, a via PI3K, iniciada através receptor acoplado à proteína G, também pode conduzir a ativação de ERK1/2 por ambas as linhagens do parasito. (KIM et al., 2006).

Assim, PI3K ativa p38 em resposta à ativação de receptores tirosina quinase ou receptores acoplados à proteína G, que culminam na regulação de um conjunto diversificado de funções biológicas (ZELCK, GEGE & SCHMID, 2007). Dessa forma, os resultados aqui apresentados sugerem que *N. caninum* manipula a via PI3K/p38 a seu favor, com a finalidade de se regular negativamente a resposta imune inata do hospedeiro (Figura 13). Neste sentido, esta via pode ser uma potencial ferramenta para intervenções terapêuticas. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar a cascata de sinalização PI3K/AKT e p38 desencadeada pelo *N. caninum* em BMDMs, e melhor determinar o papel desta via na resposta imune inata, como os mecanismos efetores. Adicionalmente, faz-se necessário desvendar quais proteínas secretadas do parasito tem a capacidade de modular ativamente esta via de sinalização intracelular.

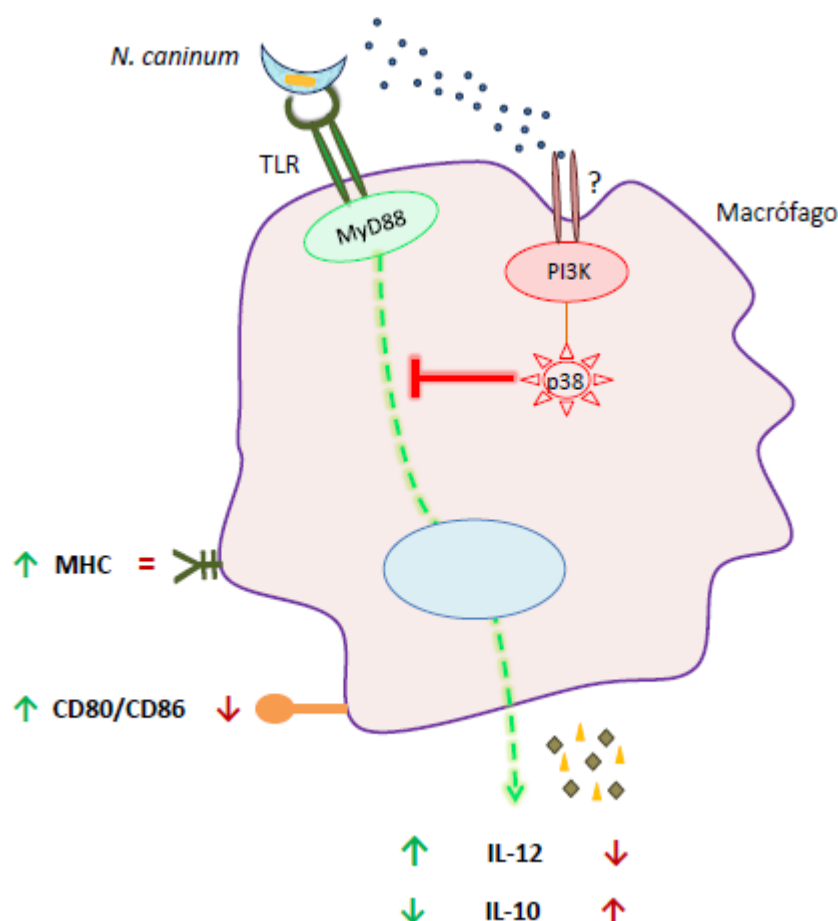


Figura 13. Modelo proposto no presente estudo para sinalização via MAPK durante infecção por *N. caninum* em macrófagos. Diagrama apresenta a participação de p38 nas vias de sinalização induzidas por MyD88 e PI3K. Após o reconhecimento de antígenos por TLRs, a ativação via MyD88 proporciona maturação dos macrófagos como células apresentadoras de antígenos, por meio do aumento da produção da citocina IL-12 e expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86), e consequente diminuição na produção de IL-10. Contudo, a fosforilação da MAPK p38, via PI3K ativado por antígenos excretados/secretados do parasito, regula negativamente tais fenômenos, levando a um aumento de IL-10 e consequente redução da produção de IL-12 e CD80/CD86. Antígenos excretados-secretados (●); citocinas (◆▲).

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados aqui descritos, podemos concluir que:

- *Neospora caninum* ativa p38, mas não JNK e ERK1/2, durante a interação inicial com macrófagos;
- A ativação de p38 é induzida por antígenos secretados/excretados de taquizoítos viáveis de *N. caninum*;
- A fosforilação de p38 leva a modulação negativa da produção de IL-12 p40 e moléculas co-estimulatórias em macrófagos;
- Em contrapartida, a ativação de p38 em macrófagos por *N. caninum* induz um aumento da citocina regulatória IL-10;
- Tal ativação da MAPK p38 é induzida por PI3K, em contraposição a sinalização pró-inflamatória induzida por TLR/MyD88;
- O bloqueio de p38 em camundongos imunizados induz um aumento da atividade de células imunes, incrementando o controle da infecção.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5º ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2005.

ADAMS, L. B., HIBBS, J. B., TAINTOR, R. R., KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**. v. 144, p.2725–2729, 1990.

AKIRA, S. & TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Review Immunology**. v. 4, p. 499–511, 2004.

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

ANDRADE, G. D., BRUHN, F. R., ROCHA, C. M., DE SÁ GUIMARÃES, A., GOUVEIA, A. M., GUIMARÃES, A. M. Seroprevalence for *Neospora caninum* in goats of Minas Gerais state, Brazil. **Research in Veterinary Science**. v. 12, p. 331-333, 2012.

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**. v. 51, p. 232-237, 2003.

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

BARRATT, J., AL QASSAB, S., REICHEL, M. P., ELLIS, J. T. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**. v. 22, p. 228–233, 2008.

BASSO, W., SHARES, S., MINKE, L., BAERWALD, A., MAKSIMOV, A., PETERS, M., SCHULZE, C., MUELLER, M., CONRATHS, F.J., SCHARES, G. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **Veterinary Parasitology**. v. 173, p. 24–31, 2010.

BASU, M. J, MOOKERJEE, A., SEN, P., BHAUMIK, S., BANERJEE, S., NASKAR, K., CHOUDHURI, S. K., SAHA, B., RAHA, S., ROY, S. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, p. 1788–1797, 2006.

BERENSON, L. S., YANG, J., SLECKMAN, B. P., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M., Selective requirement of p38a MAPK in cytokine-dependent, but not antigen receptor-dependent, Th1 responses. **The Journal of Immunology**. v. 176, 4616–4621, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, K. K., HEITMEYER, S. A., HOOKFIN, E. B., HSIEH, L. BUCHALOVA, M., TAIWO, Y. O., JANUSZ, M. J. p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. **Journal of Inflammation**. v. 5, p. 14-22, 2008.

BRUHN, F. R. P., FIGUEIREDO, V. C., ANDRADE, G. S., COSTA-JÚNIOR, L. M., ROCHA, C. M. B., GUIMARÃES, A. M. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs in rural areas in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.21, p. 161-164, 2012.

BRUMLIK, M. J., NKHOMA, S., KIOUS, M. J., THOMPSON, G. R., PATTERSON, T. F., SIEKIERKA, J. J., ANDERSON, T. J., CUIEL, T. J. Human p38 mitogen-

activated protein kinase inhibitor drugs inhibit *Plasmodium falciparum* replication. **Experimental Parasitology**. v. 128, p. 170–175, 2011b.

BRUMLIK, M. J., WEI, S., FINSTAD, K., NESBIT, J., HYMAN, L. E., LACEY, M., BUROW, M. E., CURIEL, T. J. Identification of a novel mitogen-activated protein kinase in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p. 1245–1254, 2004.

BRUMLIK, M.J., PANDESWARA, S., LUDWIG, S.M., MURTHI, K., CURIEL, T.J. Parasite mitogen-activated protein kinases as drug discovery targets to treat human protozoan pathogens. **Journal of Signal Transduction**. v. 2011, p 16pp, 2011a.

BUXTON, D.; McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends in Parasitology**. v. 18, 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**. v. 8, p.535-544, 2006.

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

CARDOSO, M. R., MOTA, C. M., RIBEIRO, D. P., NOLETO, P. G., ANDRADE, W. B., SOUZA, M. A., SILVA, N. M., MINEO, T. W. P., MINEO, J. R., SILVA, D. A. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. **Veterinary Research**. v. 29, p. 43-76, 2012.

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

COSTA, C., GERMENA, G., HIRSCH, E. Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. **ScientificWorld Journal**. v. 14, p. 1826-1839, 2010.

CRAEYE, S., SPEYBROECK, N., AJZENBERG, D., DARDÉ, M. L., TAVERNIER, P., GUCHT, S. V., DORNY, P., DIERICK, K., COLLINET, F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? **Veterinary Parasitology**. v. 178, p. 64–69, 2011.

DEBACHE, K., GUIONAUD, C., KROPF, C., BOYKIN, D., STEPHENS, C. E., HEMPHILL, A. Experimental treatment of *Neospora caninum*-infected mice with the arylimidamide DB750 and the thiazolide nitazoxanide. **Experimental Parasitology**. v. 129, p. 95–100, 2011.

DENKERS, E. Y. & GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, p. 569-588, 1998.

DENKERS, E. Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 39, p.193-203, 2003.

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

DUBEY, J. P., SCHARES, G., ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, p. 323–367, 2007.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKÅS, I.; BJÖRKMAN, C.;; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, 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.;

MODRY', 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 coccidia. **International Journal for Parasitology**. v. 32, 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**. v.192, 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**. v.193, p. 1259-1263, 1988b.

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

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

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

ELLIS, J., SINCLAIR, D., MORRISON, D., AL-QASSAB, S., SPRINGETT, K., IVENS, A. Microarray analyses of mouse responses to infection by *Neospora caninum* identifies disease associated cellular pathways in the host response. **Molecular and biochemical parasitology**. v.174, p.117–27, 2010.

ENGELMAN, J. A., LUO, J., CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**. v.7, p. 606-619, 2006.

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**. v. 123, p. 33-40, 2004.

FRENCH, N. P., CLANCY, D., DAVISON, H. C., TREES, A. J. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1691-1704, 1999.

GAESTEL, M., MENGEL, A., BOTHE, U. & ASADULLAH, K. Protein kinases as small molecule inhibitor targets in inflammation. **Current Medicinal Chemistry**. v.14, p. 2214–2234, 2007.

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

GOODSWEN, S. J., KENNEDY, P. J., ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 13, p. 133–150, 2013.

HAMMAKER, D. & FIRESTEIN, G. S. "Go upstream, young man": lessons learned from the p38 saga. **Annals of the rheumatic diseases**. v. 69, p. i77-82, 2010.

HARTGERS, F. C., OBENG, B. B., VOSKAMP, A., LARBI, I. A., AMOAH, A. S., LUTY, A. J. F., BOAKYE, D., YAZDANBAKHSH, M. Enhanced Toll-Like Receptor Responsiveness Associated with Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in *Plasmodium falciparum*-Infected Children. **Infection and Immunity**. v. 76, p. 5149–5157, 2008.

HEGAB, S. M. & AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**. v. 3, p. 84-105, 2003.

HEMPHILL, A. & GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**. v. 82, p. 497-504, 1996.

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

IMTIAZ, A., KHAN, J. D., SCHWARTZMAN, S. F., LLOYD, H. K. *Neospora caninum*: Role for Immune Cytokines in Host Immunity. **Experimental Parasitology**. v. 85, p. 24–34, 1997.

JENKINS, M. C., TUO, W., FENG, X., CAO, L., MURPHY, C., FETTERER, R. *Neospora caninum*: Cloning and expression of a gene coding for cytokine-inducing profiling. **Experimental Parasitology**. v. 125, p. 357–362, 2010.

KANG, Y. J., CHEN, J., OTSUKA, M., MOLS, J., REN, S., WANG, Y., HAN, J. Macrophage deletion of p38a partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. **The Journal of Immunology**. v. 180, p. 5075–5082, 2008.

KELLER, N., NAGULESWARAN, A., CANNAS, A., VONLAUFEN, N., BIENZ, M., BJÖRKMAN, C., BOHNE, W., HEMPILL, A. Identification of a *Neospora caninum* Microneme Protein (NcMIC1) Which Interacts with Sulfated Host Cell Surface Glycosaminoglycans. **Infection and Immunity**. v. 70, p. 3187–3198, 2002.

KIM, C., SANO, Y., TODOROVA, K., CARLSON, B. A., ARPA, L., CELADA, A., LAWRENCE, T., OTSU, K., BRISSETTE, J. L., ARTHUR, J. S., PARK, J. M. The kinase p38a serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. **Nature Immunology**. v. 9, p. 1019–1027, 2008.

KIM, E. H. & SURESH, M. Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation. **Frontiers in Immunology**. v. 4, p. 1-11, 2013.

KIM, J. Y., AHN, M. H., SONG, H. O., CHOI, J. H., RYU, J. S., MIN, D. Y., CHO, M. H. Involvement of MAPK activation in chemokine or COX-2 productions by *Toxoplasma gondii*. **Korean Journal of Parasitology**. v. 44, p. 197-207, 2006b.

KIM, L., BUTCHER, B. A., LEE, C. W., UEMATSU, S., AKIRA, S., DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 177, p. 2584-2591, 2006a.

KIM, L., RIO, L. D., BUTCHER, B. A., MOGENSEN, T. H., PALUDAN, S. R., FLAVELL, R. A., DENKERS, E. Y. p38 MAPK Autophosphorylation Drives Macrophage IL-12 Production during Intracellular Infection. **The Journal of Immunology**. v. 174, p 4178-4184, 2005.

KING, J. S., BROWN, G. K., JENKINS, D. J., ELLIS, J. T., FLEMING, P. J., WINDSOR, P. A., SLAPETA, J. Oocysts and high seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs living in remote Aboriginal communities and wild dogs in Australia. **Veterinary Parasitology**. v. 187, p. 85–92, 2012.

KING, J. S., JENKINS, D. J., ELLIS, J. T., FLEMING, P., WINDSOR, P. A., SLAPETA, J. Implications of wild dog ecology on the sylvatic and domestic life cycle of *Neospora caninum* in Australia. **Veterinary Journal**. v. 188, p. 24–33, 2011.

KING, J. S., SLAPETA, J., JENKINS, D. J., AL-QASSAB, S. E., ELLIS, J. T., WINDSOR, P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 40, p. 945–950, 2010.

KLOTZ C, ZIEGLER T, FIGUEIREDO AS, RAUSCH S, HEPWORTH MR, OBSIVAC N, SERS C, LANG R, HAMMERSTEIN P, LUCIUS R, HARTMANN S. A Helminth Immunomodulator Exploits Host Signaling Events to Regulate Cytokine Production in Macrophages. **PLoS Pathogens**. v. 7, p. e1001248, 2011.

LARSON, R. L., HARDIN, D. K., PIERCE, V. L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically

infected herds of beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 224, p. 1597–1604, 2004.

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

LAWSON, S. K., DOBRIKOVA, E. Y., SHVEYGERT, M., GROMEIER, M.. p38-alpha MAPK depletion and repression of signal transduction to translation machinery by miR-124 and -128 in neurons. **Molecular and cellular biology**. v. 1, p. 127-135, 2013.

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**. v. 85, p.1072-1075, 1999.

LIU, C. H., MACHADO, F. S., GUO, R., NICHOLS, K. E., BURKS, A. W., ALIBERTI, J. C., ZHONG, X. P. Diacylglycerol kinase zeta regulates microbial recognition and host resistance to *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 204, p. 781-792, 2007.

LUNDÉN, A.; WRIGHT, S.; ALLEN, J. E.; BUXTON, D. Immunization of mice against neosporosis. **International Journal Parasitology**. v. 32, p.867-876, 2002.

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

MARUGAN-HERNANDEZ, V., ORTEGA-MORA, L. M., AGUADO-MARTINEZ, A., ALVAREZ-GARCIA, G. Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoitespecific protein NcSAG4 in tachyzoites. **Parasitology**. v. 138, p. 472–480, 2011.

McALLISTER, M. M. & WALLACE, D. Reduce your herd's risk of *Neospora* abortions. The keys are controlling dogs and protecting our feed supplies. **Hoard's Dairyman**. v. 7, p. 438, 1999.

MINEO, J. R.; SLIVA, 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, 273p., 2005.

MINEO, T. W. P., OLIVEIRA, C. J. F., GUTIERREZ, F. R. S., SILVA, J. S. Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and Cell Biology**.v. 0, p. 1–9, 2010.

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**. v. 15, p. 188-192, 2006.

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

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

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

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p.55-63, 1983.

MUNOZ, M., LIESENFELD, O., HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**. v. 240, p. 269–285, 2011.

MURRAY, P. J. & WYNN, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization . **Journal of Leucocyte Biology**. v. 89, p. 557-563, 2011.

NAKAHARA, T., MOROI, Y., UCHI, H., FURUE, M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. **Journal of Dermatological Science**.v. 42, p. 1-11, 2006.

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**. v. 19, p.1381-1390, 2001.

O’SULLIVAN, A. W., WANG, J. H. & REDMOND, H. P. NF- κ B and P38 MAPK Inhibition Improve Survival in Endotoxin Shock and in a Cecal Ligation and Puncture Model of Sepsis in Combination With Antibiotic Therapy. **Journal of Surgical Research**. v. 152, p. 46–53, 2009.

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

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

PANADERO, R.; PAINCEIRA, A.; 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**. v. 88, p. 111-115, 2010.

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**. v. 13, p. 252-255, 2001.

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**. v. 13, p. 252-255, 2001.

PINHEIRO, A. M., COSTA, S. L., FREIRE, S. M., RIBEIRO, C. S. O., TARDY, M., EL-BACHÁ, R. S., COSTA, M. F. D. *Neospora caninum*: Early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. **Experimental Parasitology**. v. 124, p. 442-447, 2010.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; ALMEIDA, M. A. O.; TARDY, M.; EL BACHÁ, R.; COSTA, M. F. D. *Neospora caninum*: Infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes *in vitro*. **Experimental Parasitology**. v. 112, p. 193-197, 2006.

QUAN, J. H., CHA, G. H., ZHOU, W., CHU, J. Q., NISHIKAWA, Y., LEE, Y. H. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent bad phosphorylation in *Toxoplasma gondii*-mediated inhibition of host cell apoptosis. **Experimental Parasitology**. v. 133, p. 462-471, 2013.

REICHEL, M. P. & ELLIS, J. T. Control options for *Neospora caninum* infections in cattle – current state of knowledge. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 50, p. 86-92, 2002.

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

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

RIBEIRO, D. P.; FREITAS, M. M. P.; CARDOSO, M. R. D.; PAJUABA, A. C. A. M.; RINCÓN, M., ENSLEN, H., RAINGEAUD, J., RECHT, M., ZAPTON, T., SU, M. S., PENIX, L. A., DAVIS, R. J., FLAVELL, R. A. Interferon- γ expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. **The EMBO Journal**. v. 18, p. 2817–2829, 1998.

RODRÍGUEZ-PRADOS, J. C., TRAVÉS, P. G., CUENCA, J., RICO, D., ARAGONÉS, J., MARTÍN-SANZ, P., CASCANTE, M., BOSCA, L. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. **The Journal of Immunology**. v. 185, p. 605-614, 2010.

ROJO-MONTEJO, S., COLLANTES-FERNANDEZ, E., BLANCO-MURCIA, J., RODRIGUEZ-BERTOS, A., RISCO-CASTILLO, V., ORTEGA-MORA, L. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary Research**. v. 5, p. 40-49, 2009.

ROPERT, C., ALMEIDA, I. C., CLOSEL, M., TRAVASSOS, L. R., FERGUSON, M. A. J., COHEN, P., GAZZINELLI, R. T. Requirement of Mitogen-Activated Protein Kinases and I κ B Phosphorylation for Induction of Proinflammatory Cytokines Synthesis by Macrophages Indicates Functional Similarity of Receptors Triggered by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from Parasitic Protozoa and Bacterial Lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**. v. 166, p. 3423-3431, 2001.

RUHLAND, A. & KIMA, P. E. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Experimental Parasitology**. v. 122 , p. 28-36, 2009.

SALMON, R. A., GUO, X., TEH, H. S. & SCHRADER, J. W. The p38 mitogenactivated protein kinases can have opposing roles in the antigen-dependent or endotoxin-stimulated production of IL-12 and IFN-g. **European Journal of Immunology**. v. 31, p. 3218–3227, 2001.

SCHUBERT, R., GEIGER, H., ZIELEN, S., BAER, P. C. Simultaneous detection of ERK-, p38 and JNK-MAPK phosphorylation in human adipose-derived stem cells using the Cytometric Bead Array technology. **Journal of Immunological Methods**. v. 350, p. 200–204, 2009.

SHEEL, M. & ENGWERDA, C. R. The diverse roles of monocytes in inflammation caused by protozoan parasitic diseases. **Trends in Parasitology**. v. 28, p. 408-416, 2012.

SILVA, D. A., LOBATO, J., MINEO, T. W., 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**. v. 143, p. 234-44, 2007.

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

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**. v. 164, p. 320-323, 2009.

STEVENSON, M. M. & RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**. v. 4, p. 169–180, 2004.

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

TAYLOR, P. R., MARTINEZ-POMARES, L., STACEY, M., LIN, H. H., BROWN, G. D., GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review Immunology**. v. 23, p. 901-44, 2005.

TENTER, A. M.; HECKERITH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**. v.30, p.1217-1218, 2000.
the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**. v. 123, p. 25-32, 2004.

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**. v. 28, p. 1467-1472, 1998.

UTERMARK, T., RAO, T., CHENG, H., WANG, Q., LEE, S. H., WANG, Z. C., IGLEHART, J. D., ROBERTS, T. M., MULLER, W. J., ZHAO, J. J. The p110 α and p110 β isoforms of PI3K play divergent roles in mammary gland development and tumorigenesis. **Genes & Development**. v. 26, p. 1573-1586, 2012.

VANHAESEBROECK, B., GUILLERMET-GUIBERT, J., GRAUPERA, M., BILANGES, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. **Nature Reviews - Molecular cell biology**. v. 11, p. 329-341, 2010.

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

WEI, S., DANIEL, B. J., BRUMLIK, M. J., BUROW, M. E., ZOU, W., KHAN, I. A., WADSWORTH, S., SIEKIERKA, J., CURIEL, T. J. Drugs Designed To Inhibit Human p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Treat *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, p. 4324–4328, 2007.

WEI, S., MARCHES, F., DANIELA, B., SONDA, S., HEIDENREICH, K., CURIELA, T. Pyridinylimidazole p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors block intracellular *Toxoplasma gondii* replication. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 969–977, 2002.

WESTON, J. F., HEUER, C., WILLIAMSON, N. B. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 103, 136–144, 2012.

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

WILLIAMS, D. J., GUY, C. S., SMITH, R. F., ELLIS, J., BJORKMAN, C., REICHEL, M. P., TREES, A. J. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. **Infection and Immunity**. v. 75, p. 1343–1348, 2007.

YANG, Z., ZHANG, X., DARRAH, P. A., MOSSER, D. M., The Regulation of Th1 Responses by the p38 MAPK. **The Journal of Immunology**.v. 185, p. 6205-6213, 2010.

YAROVINSKY, F., ZHANG, D., ANDERSEN, J. F., BANNENBERG, G. L., SERHAN, C. N., HAYDEN, M. S., HIENY, S., SUTTERWALA, F. S., FLAVELL, R. A., GHOSH, S., SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**. v. 10, p. 1626-1629, 2005.

YU, J. J., TRIPP, C. S., RUSSELL, J. H. Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway. **The Journal of Immunology**. v. 171, p. 6112–6118, 2003.

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**. v. 71, p. 113–115, 2009.

ZELCK, U. E., GEGER, B. E. & SCHMID, S. Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and PI3-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 31, p. 321–331, 2007.

ANEXO I



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

ANÁLISE FINAL Nº 089/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 029/12

Projeto Pesquisa: "Avaliação do papel das vias de sinalização e fatores de transcrição em células apresentadoras de antígeno frente a *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*"

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. José Roberto Mineo

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

.

Uberlândia, 26 de Setembro de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU